



ПЛАЗМИДЫ КАК ВЕКТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ПРИ ПЕРЕДАЧЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

IV рабочего совещания по программе "Плазмида"

Тарту 1979

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
МЕЖДУВЕДОМСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ СОВЕТ
ПО ПРОБЛЕМАМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ГЕНЕТИКИ ПРИ ГОСКОМИТЕТЕ СССР ПО НАУКЕ И ТЕХНИКЕ
И ПРЕЗИДИУМЕ АКАДЕМИИ НАУК СССР НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ ПРИ СОВЕТЕ МИНИСТРОВ СССР
ОТДЕЛ ВНЕХРОМОСОМНОЙ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ
ВСЕСОЮЗНОГО НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА
БИОСИНТЕЗА БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ
МИНВУЗ СССР
ТАРТУСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ПЛАЗМИДЫ КАК ВЕКТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ПРИ ПЕРЕДАЧЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

IV рабочее совещание по программе "Плазмида"
(23-24 сентября 1979 г., Тарту-Кяэрику)

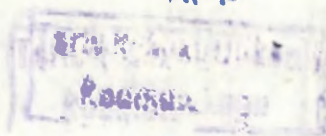
ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

ТАРТУ 1979

Редакционная коллегия:

А. Хейнару /отв. ред./, Х. Каллак /зам. отв. ред./.

INSTITUTUD



5588

С о д е р ж а н и е

Абалакина Е.Г., Зимина М.С., Якубов Л.З., Степанов А.И. Получение и свойства плазмиды pAS4	II
Алешкин Г.И., Евдокимова Н.М., Демкин В.В., Скваронская А.Г. Конструирование штаммов-реципиентов <i>E. coli</i> для рестриктазозависимого клонирования фрагментов ДНК <i>in vivo</i>	I2
Амиров Э.Я., Ваулина Т.Г. Взаимодействие фага λ и плазмиды ColBtet с транспозонами	I3
Анисимова Л.А., Пориц А.Л., Воронин А.М. Характеристики плазмид резистентности бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	I4
Анискин Е.Д., Константинов П.А., Кулагин А.Н., Климова М.Ю., Крылов О.Р., Шестаков В.А. Генетический контроль устойчивости микроорганизмов к производным левомицетина	I5
Арсениян С.Г., Авдонина Т.А., Киселев Л.Л., Лавинг А.Й., Саарма М.Ю. Выделение и клонирование 5S ДНК из печени крысы	I6
Бажан С.И., Лихошвай В.А. Численное моделирование процессов регуляции функционирования генома фага лямбда	20
Белова Н.В., Герасимова Л.М., Загребельный С.Н., Камнина Т.П., Пустошилова Н.М., Сайкович Е.Г., Старостина В.К. Синтез высокомолекулярных полинуклеотидов с липкими концами в системе ДНК-полимеразы I <i>E. coli</i>	2I
Белокхрысенко С.С., Самсонова А.П. Дальнейшее изучение структуры крупных клинических R-плазмид	25
Беляев А.С., Гусев В.А., Щелкунов С.Н., Малыгин Э.Г. Изучение выщепления гомологичных последовательностей ДНК из генома гибридных фагов λ	28

Белькинд А.М., Гараев М.М., Бартошевич Ю.Э. Обнаружение плазмидной ДНК у штамма <i>Escherichia coli</i> продуцента пенициллинамидогидролазы	29
Блинов А.Г., Головин С.Я., Чесноков В.Н., Мертвецов Н.П. Экспрессия нативных ДНК и рестрикционных фрагментов в сопряженных системах транскрипции-трансляции	30
Бобкова А.Ф., Бобков А.Ф., Гараев М.М., Кислина О.С., Зинченко А.И. Клонирование ДНК <i>Candida utilis</i> в клетках <i>Escherichia coli</i>	30
Бондаренко В.М., Тимофеева И.Т. Фенотипическое выражение H_2S и $F'lac$ плазмид, обнаруженных в штамме <i>Citrobacter freundii</i> , выделенном от больного диареей	31
Боровик А.С., Каламбет Ю.А., Любченко Ю.Л., Черный Д.И., Шитов В.Т. Карты равновесного плавления и локализации мест посадки РНК-полимеразы на ДНК плазмиды ColE1	33
Бочканов С.С., Самсонова А.П., Белокрысенко С.С. Характеристика и взаимоотношения плазмид у клинического штамма <i>E. coli</i> PI2010	36
Былинский А.Ф., Гриц Н.В., Белявский К.М., Максимова Н.П. Выражение и стабильность плазмиды RP4, переданной от <i>E. coli</i> природным штаммам <i>Pseudomonas</i>	39
Веревкин В.В., Чернин Л.С. Рекомбинация R и F' плазмид, несущих транспозон устойчивости к тетрациклину, в штаммах <i>Escherichia coli</i> K12	42
Виллемс Р.Л.-Э., Хейнару А.Л., Хабиخت Я.К. Физическая и генетическая карта TOL-плазмиды pWWO...	43
Воложанцев Н.В., Степаншин Ю.Г., Данилевич В.Н., Амосенко Ф.А. Делеционные ревертанты термочувствительной по поддержанию плазмиды pEG1 (RP4-ts1)	46

Ганелин В.Л., Денисов А.А., Сазыкин Ю.О., Навашин С.М. Аминогликозид-3'-фосфотрансферазы, детерминируемые транспозонами Tn601 и Tn5	48
Глатман Л.И., Мороз А.Ф., Афиногенов Г.Е., Яблокова М.Б., Тягуненко Ю.В. Анионные поверхностно-активные вещества как ингибиторы передачи конъюгативных R и Hly плазмид	49
Голубков В.И., Ионтова И.М., Бойцов А.С., Гупалова Т.В., Тотолян А.А. Внехромосомная природа фактора вирулентности у стрептококков группы A .	51
Григорьева С.П., Домарадский И.В., Шекина Е.В., Ясеневиц О.В., Бузург-заде Д.Л. К вопросу о трансформации дрожжей	53
Гусев В.А., Щелкунов С.Н. Особенности параметров одиночного цикла размножения гибридных и мутантных фагов лямбда	54
Данилевская О.Н., Басс И.А., Мекедов С.Л. Получение гибридных плазмид, несущих гены РНК-полимеразы <i>Escherichia coli</i> K12	55
Денисова Л.Я., Загребельный С.Н., Килева Е.В., Пустошилова Н.М., Филиппов В.А. Исследование транскрипции ДНК плазмиды ColE1	57
Ермоленко З.М. Изучение стабильности плазмид в ResA ⁺ и ResA ⁻ штаммах <i>E. coli</i>	60
Завенягина Т.Н., Хмель И.А., Рекеш А.Н. Исследование рибонуклеазной активности в клетках <i>E. coli</i> с плазмидой v-K30	61
Загребельный С.Н., Путинцева Н.И., Пучкова Л.И., Соктоев С.А., Пустошилова Н.М., Салганик Р.И., Панфилова З.И. Получение гибридных плазмид, содержащих гены <i>Bacillus subtilis</i>	65
Ильина Т.С., Романова Ю.М., Нечаева Е.В., Смирнов Г.Б. Специфичность взаимодействия транспозонов с различными геномами и некоторые данные о генетическом контроле этого процесса	68

Ильичев А.А., Холодильов Н.Г., Киселев Н.Н., Мординов В.А. Клонирование ДНК вируса ядерного полиэдроза <i>Galleria mellonella</i> L. /большой вошиной моли/ в системе <i>E. coli</i> с использованием плазмиды pSF2124	68
Йомантас Ю.В., Бандрин С.В., Розинов М.Н., Рабинович П.М., Степанов А.И. Конструирование и изучение двурепликонных гибридных плазмид, содержащих гены биосинтеза рибофлавина	69
Карпова И.С. Устранимая акридиновым оранжевым нестабильность мутантов <i>Bacillus subtilis</i> индуцированных с помощью ДНК сельди	70
Кильк А.Х., Хейнару А.Л., Касак Л.А. Индукция синтеза катехол-2,3-оксигеназы и ранних мРНК у штаммов псевдомонад	74
Кисличкин Н.Н., Коротяев А.И., Домарадский И.В. Использование Т-фагов для ускоренной идентификации Р-плазмид некоторых групп несовместимости	78
Ковалев Ю.Н., Федосеева В.Б., Данилевская О.Н., Александров А.А., Миндлин С.З. Трансдуцирующие фаги с генами <i>groV</i> и <i>groC</i> РНК-полимеразы, происходящие из фага λ att80	79
Коротяев А.И., Кисличкин Н.Н., Манувахова М.Ш., Панов А.Г., Максимов В.Ф., Малышева Т.В., Домарадский И.В. Новый вариант выделенной из природы кишечной палочки и его использование для изучения плазмид	84
Корягина И.П., Бондаренко В.М. Плазмиды уропатогенных штаммов <i>Escherichia coli</i>	86
Кочетков В.В., Еремин А.А., Перебитюк А.Н., Старовойтов И.И., Боронин А.М. Новая плазида биодегградации нафталина	88

Курносова Л.М., Суворова Т.И., Домарадский И.В. Данные о новых R плазмидах <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89
Ларионов В.Л., Аверьянов А.В., Гаузе Г.Г. Выделение 25 мк кольцевой митохондриальной ДНК из дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
Ларионов В.Л., Гришин А.В. 3 мк ДНК - новая плазмида дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	94
Лобанок Т.Е., Песнякевич А.Г., Фомичев Ю.К. Поведение Rts1 -плазмиды <i>Proteus vulgaris</i> в гетерологичных хозяевах	98
Манувахова М.Ш., Коротяев А.И., Рейнгольд В.Н., Шестопалова Н.М., Домарадский И.В. Плазмида pKMR ₇₇ и чувствительность культур, несущей ее, к фагу KM2	100
Минина Т.С., Андреевская Е.А., Домарадский И.В. Участие Inc P-1 плазмиды R638 в переносе хромосомных маркеров	102
Могильская С.П., Иванова Э.А., Исаевич Л.В., Филькова Э.В., Домарадский И.В. Изучение биологической активности ДНК плазмиды гемолиза, меченой транспозонами Tn ⁺ 1 и Tn ⁺ 10, на разных видах бактерий	103
Наумов Г.Н., Керопиан Е.А., Зенцова О.А., Домарадский И.В. Перенос плазмид группы несовместимости P в клетки метанолусваивающей бактерии <i>Pseudomonas methanolica</i>	104
Наумова Г.Н., Александров А.А., Голованов Е.И. Исследование транскрипции плазмиды ColE1 методом электронной микроскопии	107
Нумеров В.К., Рудченко О.Н., Левина Н.Б., Домарадский И.В. Конструирование гибридных плазмид, несущих детерминанту гемолитической активности	109

Оленина Н.А. Стабильность генов устойчивости к нитрофурановым препаратам у кишечных бактерий	II0
Оленина Н.А., Лушников А.А., Шендеров Б.А., Домарадский И.В. Физические размеры плазмиды, контролирующей нитрофуранорезистентность у кишечных палочек	II0
Перебитюк А.Н., Воронин А.М. Взаимодействие с мембраной плазмидной ДНК в процессе репликации в мини-клетках	III
Перебитюк А.Н., Еремин А.А., Борисоглебская А.Н., Воронин А.М. Плазмидная ДНК в штаммах <i>Pseudomonas putida</i> линии BSA	II3
Перерва Т.П., Малюта С.С. MS2-индуцированные мутанты <i>E. coli</i> по F-фактору, характеризующиеся нарушением регуляции роста и деления	II6
Пехов А.П. Проблемы эволюции бактериальных плазмид.	I20
Руднева С.Н., Столярова Л.Г., Буянова Н.И., Ершов А.А., Пастернак Н.А. Изучение плазмид клинических штаммов энтеропатогенных кишечных палочек	I23
Рудченко О.Н., Левина Н.Б., Никитин А.Н. К вопросу об эффективности трансформации и трансфекции различных штаммов <i>E. coli</i> изолированными ДНК и способах увеличения трансформабельности отдельных штаммов	I25
Рязанкина О.И., Кренделева Л.Я., Бурцева Л.И. Умеренные фаги морфологических мутантов <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i>	I26
Рязанова Л.А., Чемлева Н.Г. Характеристика конъюгационной активности морфологических мутантов <i>Escherichia coli</i> K12	I27
Саарма М.Ю., Рээман К.Ю., Талпсепп Т.Э., Тоотс И.Э. Клонирование фрагментов рДНК эукариот с гетерологическими липкими концами	I29

Сабельников А.Г., Домарадский И.В. Влияние метаболических ингибиторов и мембранотропных агентов на трансформацию <i>E. coli</i> плазмидной ДНК	I31
Скавронская А.Г., Алешкин Г.И., Бруханский Г.В. Зависимость участия плазмиды pKM101 в репарации УФ-повреждений и мутагенезе <i>E. coli</i> от "цис" или "транс"-положения плазмиды	I32
Смирнов Г.В., Ильина Т.С., Горелов В.Н. Генетический контроль и механизм образования F'-плазмид у <i>Escherichia coli</i> K12	I34
Степаншин Ю.Г., Амосенко Ф.А., Данилевич В.Н. Влияние функциональной активности транспозона на эффективность интеграции R-фактора RP4 с хромосомой <i>E. coli</i>	I35
Таллмейстер Э.Т., Тюри М.Э., Тюри Э.И., Хейнару А.Л. Изучение плазмид у уропатогенных штаммов бактерий	I38
Таллмейстер Э.Т., Хейнару А.Л. Исследования плазмид, резистентности к солям тяжелых металлов и других биологических свойств штаммов псевдомонад, выделенных из речной воды и из почвы	I39
Урлапова С.В., Якубов Л.З., Степанов А.И. Картирование генов репликации плазмиды RP4	I41
Филькова Э.В., Березкина Н.Е. Определение группы несовместимости плазмиды гемолиза Hly 195	I42
Филькова Э.В., Березкина Н.Е. Влияние транспозонов Tn1 и Tn10 на совместимость плазмиды гемолиза Hly 195 с R-подобными плазмидами	I43
Филькова Э.В., Березкина Н.Е., Домарадский И.В. Транспозиция детерминанты устойчивости к тетрациклину от фактора R222 в плазмиду гемолиза Hly 195	I44
Хабихт Я.К., Виллемс Р.Л.-Э., Хейнару А.Л., Порс А.Г.-Р. Генетическое и молекулярно-биологическое изучение TOI ⁺ -плазмиды	I45

Хайкинсон М.Я., Бебуров М.Ю., Степанов А.И. Характеристика транспозона <i>Tn3</i> , содержащего ДНК плазмиды <i>pUB110</i>	I47
Хейнару А.Л. Плазмиды биodeградации	I48
Хейнару А.Л., Виллемс Р.Л.-Э., Тарк Э.Р. Плазмида <i>pBR322</i> как потенциальная векторная молекула для <i>Pseudomonas putida</i>	I50
Хейнару А.Л., Домарадский И.В., Бородинина О.В. Местные штаммы псевдомонад, имеющие <i>TOL</i> -, <i>SAM</i> -, <i>OCT</i> -, <i>NAH</i> -, <i>SAL</i> - и <i>TFD</i> -плазмиды	I51
Хейнару А.Л., Таллмейстер Э.Т. Плазмидная резистентность к рифампицину у штаммов <i>Escherichia coli</i>	I53
Чернявский В.А., Куприна Н.Ю., Зеров Ю.П. Сферопласты дрожжей как экспериментальная модель исследования генетической трансформации	I55
Шендеров Б.А., Рудченко О.Н., Оленина Н.А. Генетический анализ лекарственной устойчивости полирезистентного штамма кишечной палочки клинического происхождения	I57
Щипков В.П., Дробышева Н.А., Щипкова Н.И., Кузькина С.Н., Пехов А.П. Изучение конъюгативности и мобилизационной способности плазмид, идентифицированных в штаммах <i>E. coli</i> различного происхождения	I58
Щипков В.П., Решетникова В.Н., Дробышева Н.А., Губарь Е.В., Пехов А.П. Поиски факторов переноса в бактериях штаммов <i>E. coli</i> естественного происхождения и их характеристика	I60
Щукин Н.Н. Причины нестабильности плазмиды <i>FColVB</i> <i>trp</i> в <i>Erwinia arcoridae</i>	I63
Авторы тезисов	I65

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПЛАЗМИДЫ pAS4

Абалакина Е.Г., Зимина М.С., Якубов Л.З., Степанов А.И.
Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Сконструирована плазмида pAS4, содержащая часть малого EcorI фрагмента плазмиды R6K, участок транспозона Tn7, определяющий устойчивость к триметаприму (Tr) и стрептомицину (Sm) и имеющая I участок узнавания рестриктазы EcorI.

ДНК ряда производных R6K ApSm :: Tn7, полученных путем интеграции Tn7 в точечный мутант R6K ApSm⁻, была обработана рестриктазой EcorI, лигазой и использована для трансформации клеток E.coli C600. Трансформанты отбирали по устойчивости к Tr и Sm и чувствительности к Ap.

С помощью методов электрофореза и гетеродуплексного анализа показано, что молекулярный вес полученной плазмиды pAS4 равен 10,8 Md, в состав pAS4 входят часть малого EcorI фрагмента R6K, примыкающего к EcorI участку 2, и часть транспозона Tn7 с молекулярным весом 2,7 Md.

Плазмида pAS4 присутствует в клетке в количестве 15-20 копий на хромосому и несовместима с плазмидами R6K и pAS3. pAS4 комплементирует tra⁻ мутации R6K, локализующиеся в малом EcorI фрагменте, и мобилизуется плазмидой R100-1.

С помощью рестрикции EcorI, лигирования и последующей трансформации получены гибриды pAS4-плазмиды puv110, pAS10-1 и pAS13. Изучено число копий гибридов в зависимости от молекулярного веса и природы встроенного фрагмента.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ-РЕЦИПИЕНТОВ *E. coli* ДЛЯ
РЕСТРИКТАЗОЗАВИСИМОГО КЛОНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ
ДНК *IN VIVO*

Алешкин Г.И., Евдокимова Н.М.,
Демкин В.В., Скавронская А.Г.

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Эндонуклеазы рестрикции, в частности рестриктаза *EcoR1*, способствуют рекомбинации *in vivo* плазмиды, кодирующей рестриктазу, с поступающей в клетку *E. coli* чужеродной ДНК. Нами осуществлено получение сложных рекомбинантных плазмид *in vivo*, несущих различные сочетания плазмидных и хромосомных генов *E. coli*, вводимых в клетку путем конъюгации или трансдукции. Получение таких плазмид не зависит от *resA* гена *Cohen* и соавторы показали возможность рекомбинации эукариотной ДНК и плазмидной ДНК в клетках-продуцентах *EcoR1* при введении эукариотной ДНК путем трансформации.

Вышесказанное свидетельствует о возможности клонирования фрагментов любой ДНК *in vivo*, если возможно ее введение в реципиент, несущий плазмиду, кодирующую *EcoR1*. Существующие плазмиды, кодирующие рестриктазу *EcoR1*, реплицируются репликатором типа *ColE1*. Они не способны наследоваться в *ResBCSbcB* штаммах *E. coli*, способных служить реципиентами в трансформации. С целью получения плазмиды, несущей гены рестриктазы *EcoR1*, но способной наследоваться в *ResBCSbcB* штаммах, мы провели рекомбинацию плазмид *pSA1* и *R245* *in vivo* с отбором плазмид, несущих все известные гены обеих плазмид. Клонирование рекомбинантных плазмид в *PoliA1* штамме *P3478*, не наследующем плазмиды, реплицирующиеся по *ColE1* типу, позволило отобрать плазмиду *pSA1001*. Эта плаزمида несет гены *EcoR1*, но не имеет генов продукции колицина и, очевидно, репликатора *ColE1*, так как она наследуется в *PoliA1* штамме *E. coli*. Плазмида *pSA1001* передана в штамм *GA87 ResBCSbcB*, сконструированный нами ранее. Полученный в

результате штамм-реципиент GA2000 является эффективным реципиентом в трансформации, несет плазмиду, кодирующую EсoR1, не имеет иной системы рестрикции-модификации ДНК, кроме системы EсoR1.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАГА λ И ПЛАЗМИДЫ ColBtet С ТРАНСПОЗОНАМИ

Амиров Э.Н., Ваулина Т.Г.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

Изучалась возможность и частота взаимодействия фагов λ дикого типа и температуроиндуцибельного варианта- λ с1857 с фагом P1, несущим хлорамфениколовый транспозон, и RP1-фактором устойчивости, несущим ампициллиновый транспозон.

Обнаружено, что частота образования фага λ дикого типа, несущего транспозон устойчивости к хлорамфениколу, почти на два порядка ниже, чем у температуроиндуцибельного варианта. Образование фага λ , несущего транспозон устойчивости к ампициллину, было выявлено только у температуроиндуцибельного варианта фага λ и только в ResA⁻ условиях. Показано, что в ResA⁺ клетках, несущих RP1-фактор, по сравнению с аналогичными ResA⁻ клетками, титры фага λ в два раза ниже, а размер бляшек уменьшается в 5-6 раз.

При размножении фага P1cm на клетках, содержащих ColBtet-плазмиду, обнаружено и доказано образование новой плазмиды -ColBtetcm.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМИД РЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Анисимова Л.А., Пориц А.Л., Воронин А.М.
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
АН СССР, г. Пушкино

Плазмиды резистентности являются одним из механизмов, позволяющих микроорганизмам приспосабливаться к жизни в самых различных условиях окружающей среды.

В докладе представлены данные по изучению устойчивости бактерий рода *Pseudomonas* к некоторым соединениям металлов и амфолитов, детерминированной плазмидами резистентности из клинических штаммов *Ps. aeruginosa*, выделенных в клиниках нескольких городов Советского Союза, и плазмидами биodeградации почвенных штаммов *Ps. putida*.

Установлено, что у 80% плазмид, изолированных из клинических штаммов *Ps. aeruginosa*, устойчивость к антибиотикам связана с резистентностью к ионам ртути. Была изолирована одна плазида, детерминирующая устойчивость только к ионам ртути. У 9% плазмид резистентность к ионам ртути коррелировала с устойчивостью к органическим соединениям ртути: мертиалату, фенилмеркурбромиду, фенилмеркурхлориду, этилмеркуриодиду. Все плазмиды, относящиеся к Р-2 группе определяли устойчивость к теллуриду калия. Показано, что некоторые плазмиды устойчивости к антибиотикам групп Р-2 и Р-5 несут ген /гены/ резистентности к оксианионам бора и хрома.

У ряда клинических штаммов, несущих плазмиды множественной лекарственной устойчивости, а также у штаммов содержащих плазмиды биodeградации, изучалась устойчивость к соединениям органического олова: триэтилстанилсукцинилимиду, триэтилстанилмолеинитимиду.

Установлено, что устойчивость к соединениям органического олова контролируется плазмидными генами, которые связаны с R-детерминантами. Гены устойчивости к соединениям органического олова передаются при конъюгации с высокой частотой

вместе с маркерами лекарственной устойчивости.

Из всех исследуемых плазмид биodeградации гены устойчивости к соединениям органического олова связаны только с SAM-плазмидой, контролирующей деградацию камфора.

На устойчивость к соединениям органического олова исследовались плазмиды различных групп несовместимости. Но к соединениям органического олова устойчивы только плазмиды, принадлежащие Inc P-2 группе. Плазмиды бактерий рода *Pseudomonas* определяли трехкратное увеличение минимальной ингибирующей концентрации станилорганических соединений.

Устойчивость к станилорганическим соединениям специфически связана с устойчивостью к теллуриту калия, так как все устойчивые к станилорганическим соединениям штаммы показывали различного уровня устойчивость к теллуриту калия.

У 9 плазмид, контролирующих деградацию нафталина, исследовалась устойчивость к ионам серебра и теллуриту калия. У одного почвенного штамма обнаружена устойчивость к высоким концентрациям теллурита калия, связанная с плазмидой катаболизма нафталина. Две другие плазмиды определяли чувствительность к ионам серебра.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ УСТОЙЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К ПРОИЗВОДНЫМ ЛЕВОМИЦЕТИНА

Анискин Е.Д., Константинов П.А., Кулагин А.Н.,

Климова М.Д., Крылов О.Р., Шестаков В.А.

Научно-исследовательская Лаборатория
экспериментальной иммунобиологии АМН СССР, Москва

Резистентность к левомицетину /МК₅₀ > 200 мкг/мл/ у большинства клинических изолятов *E.coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. связана с инактивирующим действием фермента хлорамфениколацетилтрансферазы, синтез которого контролируется плазмидами.

Среди ряда производных левомицетина варианты с изменен-

ной пропандиловой цепью $/CO-C=CH_2$, $CO-CH-CH_2$ Br / не ацетилировались в среде с устойчивыми микроорганизмами. МЭК не ацетилирующихся производных для штаммов, содержащих плазмиды с детерминантами резистентности к левомицетину, чувствительных клинических изолятов *E.coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., а также для штаммов, у которых плазмиды элиминировали акридиновым оранжевым, составляла $\geq 15 < 50$ мкг/мл.

Однако пассирование чувствительных к левомицетину микроорганизмов в среде с возрастающей концентрацией производных приводит к относительно быстрой селекции штаммов, устойчивых к 120-150 мкг/мл препаратов. В последнем случае признак резистентности не элиминировался акридиновыми красителями, не передавался чувствительным реципиентам и не обусловлен активностью хлорамфениколацетилтрансферазы.

По-видимому, устойчивость у выделенных микроорганизмов контролировалась бактериальной хромосомой. Это необходимо учитывать при синтезе и изучении различных производных левомицетина.

Параллельно исследуются механизмы резистентности к левомицетину на соматических клетках человека в культуре тканей.

ВЫДЕЛЕНИЕ И КЛОНИРОВАНИЕ 5S ДНК ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС

Арсения С.Г., Авдоница Т.А., Киселев Л.Л.,

*Лавинг А.И., *Саарма М.Ю.

Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва;

*Институт физики АН ЭССР, Тарту

Изучение организации генома эукариот является одной из основных задач молекулярной биологии. Для выяснения структуры генов необходимо иметь гомогенные фракции ДНК, содержащие кроме структурных частей генов и примыкающие к ним регуляторные области. Разработаны два основных подхода для получения таких фрагментов ДНК: построение рекомбинантных плазмид

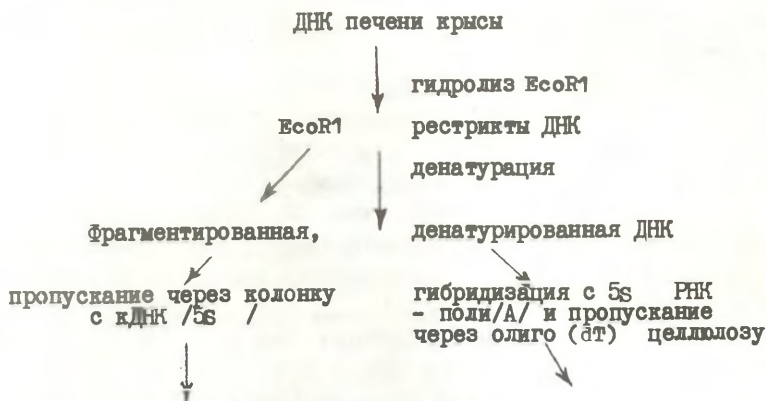
или фагов, содержащих случайный набор фрагментов ДНК /так называемый "shotgun" метод/ с последующим отбором соответствующих рекомбинантных клонов при помощи молекулярной гибридизации с радиоактивной мРНК, рРНК или кДНК. Методом "shotgun" построены банки генов в плазидах для *E. coli*, *S. cerevisiae* и *D. melanogaster*. Этот метод позволяет выделять и гены рРНК высших организмов. Учитывая размеры геномной ДНК млекопитающих и количество генов рибосомных РНК, можно легко рассчитать, что при "shotgun" клонировании рестрикционных фрагментов тотальной геномной ДНК гены 18S, 5.8S и 28S РНК появляются среди рекомбинантов с вероятностью 1/2000, а гены 5S РНК - с вероятностью 1/10000. Отсюда следует, что работа по отбору клонов, содержащих гены рРНК, весьма трудоемка. Поэтому предварительное обогащение соответствующих последовательностей перед клонированием намного облегчает отбор клонов.

Второй путь выделения генов и состоит в предварительном получении обогащенных фракций ДНК /по интересующим структурным генам/ с последующей амплификацией этих фракций. Один из основных способов предварительного обогащения препарата по определенным генам заключается в раздельном обогащении каждой из комплементарных цепей ДНК при гибридизации с мРНК или комплементарной ей ДНК /кДНК/, полученной путем обратной транскрипции по мРНК и последующей реассоциацией цепей. Таким способом были получены обогащенные /+/ и -/ цепи овальбуминового гена. Целью настоящей работы явилось дальнейшее развитие этого подхода и использование его для обогащения таких генов, продукты транскрипции которых не содержат поли /А/ последовательностей. В качестве объекта исследования были выбраны гены 5S рРНК млекопитающих, выделение которых в литературе не описано, хотя гены 5S РНК выделены из *S. cerevisiae*, *X. laevis*, *D. melanogaster* и из некоторых других низших эукариот, а также получены данные об их структурах организации.

В прокариотах и низших эукариотах гены 5S РНК расположены отдельно от других генов рРНК в виде тандемов. Поэтому мы решили использовать такой метод дробления ДНК, который давал бы фрагменты, содержащие гены 5S РНК со спейсерами.

Использованная нами рестриктаза *EcoRI* была выбрана исходя из того, что она узнает длинный участок на ДНК и образует крупные фрагменты с липкими концами. Более того, *EcoRI* фрагменты ДНК очень удобно клонировать в плазмиду *pBR325* так как уникальный сайт *EcoRI* находится в гене устойчивости к хлоремфениколу.

Как показали наши результаты, после гидролиза крысиной ДНК рестриктазой *EcoRI*, с последующей гибридизацией по методу Сазерна с использованием ^{32}P 5S РНК. 5S гены сосредоточены в основном во фрагментах длиной от 3 до 7 мегadalтон. Для выделения и клонирования фрагментов ДНК, обогащенных по 5S ДНК, использовали схему, показанную на рис. Существенным элементом схемы является полиаденилирование 5S РНК, используемой затем как для выделения $+/+$ -цепей, так и $/-/-$ -цепей через синтез кДНК. В некоторых опытах для выделения $+/+$ -цепей 5S ДНК, мы применяли пришитую к сефарозе 5S РНК. Оказалось, что при повышенных температурах и формамид-содержащие буферные растворы вымывают с колонок 5S РНК, мешающую дальнейшей гибридизации. Используя приведенную выше схему, удалось выделить фракции ДНК из печени крыс, обогащенной по содержанию генов 5S РНК в 350-400 раз. При клонировании обогащенных фракций в плазмиду *pBR325* из 300 рекомбинантов 2 содержали 5S ДНК.



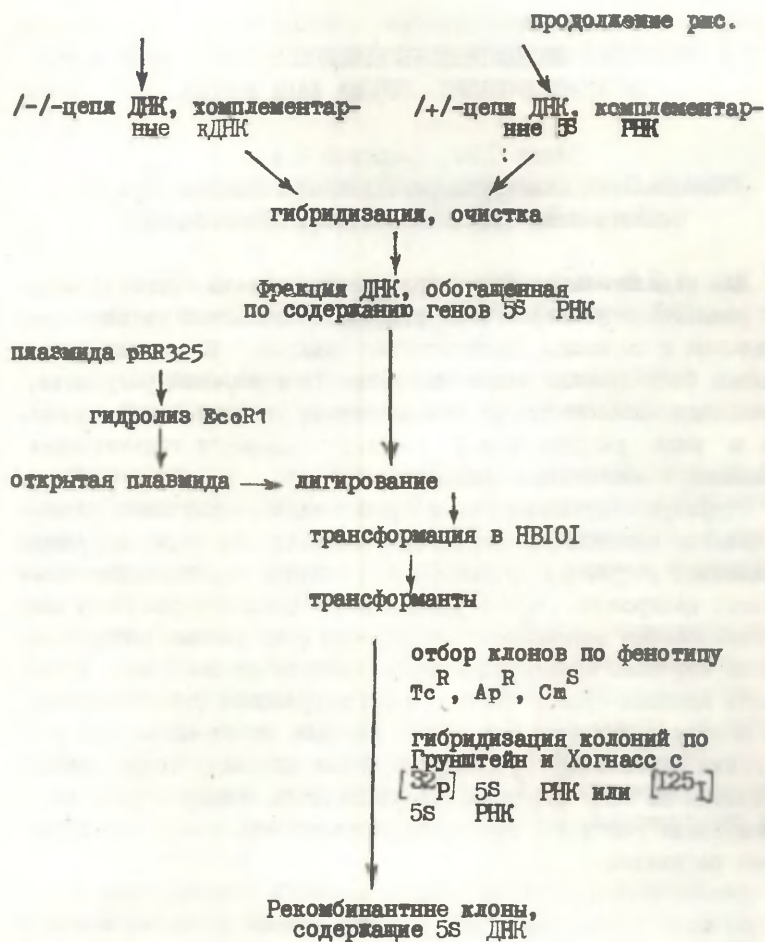


Рис. Выделение и клонирование 5S ДНК из печени крысы

ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЕНОМА ФАГА ЛЯМБДА

Бахан С.И., Лихотвай В.А.

Специальное конструкторско-технологическое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск

Для моделирования функционирования генома фага лямбда был разработан универсальный подход, основанный на описании процессов в терминах биохимических реакций. В рамках этого подхода были описаны общие механизмы генетической регуляции, отражающие особенности функционирования геномов, представленных в виде упорядоченной последовательности генетических элементов с известными свойствами.

Структурно-функциональная организация генома фага лямбда явилась основой для описания известных или постулируемых механизмов регуляции активности основных генетических элементов: цистронов, промоторов, терминаторов и др., так как функциональная организация элементов его генома достаточно хорошо изучена. Критерием непротиворечивости описанных механизмов явилась удовлетворительная корреляция функционирования модели с экспериментальными данными, полученными для нескольких мутантов фага лямбда. В тех случаях, когда такие механизмы не были известны, потребовалась проверка ряда альтернативных гипотез, позволяющих определить возможные механизмы регуляции.

Анализ результатов численных расчетов и данных литературы позволил установить, что развитие генома в клетке существенно зависит не только от активности процессов транскрипции, репликации, репарации и деградации ДНК, но также от особенностей регуляторных взаимоотношений между этими процессами. В частности, показано, что столкновение волн транскрипции и репликации в процессе функционирования генома, а также взаимосвязь процессов репарации и деградации при репликации ДНК имеют важное значение в регуляции активности генома. Эффективность механизмов зависит от структуры генома, а также от

некоторых начальных данных, определяемых генотипом хозяйской клетки, множественностью заражения и другими внешними факторами.

СИНТЕЗ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ С ЛИПКИМИ КОНЦАМИ В СИСТЕМЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ I Е. COLI

Белова Н.В., Герасимова Л.М., Загребальный С.Н.,
Камынина Т.П., Пустошилова Н.М., Сайкович Е.Г.,
Старостина В.К.

Специальное конструкторско-техническое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск

Использование синтетических двухцепочечных молекул ДНК с повторяющимися последовательностями, удлинёнными ДНК-полимеразой I до макромолекулярных размеров, открывает возможности для получения синтетических моделей генов и исследования их выражения в клетках *E.coli*.

Исследовали возможность получения высокополимерного продукта, содержащего "липкие" 5-концевые последовательности, узнаваемые рестриктазой *EcoR*I, в системе ДНК-полимеразы I *E. coli*. В качестве матрицы-затравки использовали полинуклеотиды λ ААТТС—поли-А и λ ААТТС—поли-Т длиной 80-100 нуклеотидов, полученные ранее путем удлинения химически синтезированного олигонуклеотида λ ААТТС в системе терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы.

В связи с поставленной задачей подбирали условия, в которых ДНК-полимераза максимально удлиняет исходную матрицу. Принимая во внимание тот факт, что экзонуклеазная активность, присущая ДНК-полимеразе I, в 2-3 раза ниже в К-фосфатном буфере, чем в трис-НС1 буфере, сравнили включение ^3H -ТМР в полимерную фракцию в этих буферных системах /рис. 1/. Оказалось, что при проведении реакции в 50мМ К-фосфатном буфере /рН 7,3/ количество нмолей ^3H -ТМР, присоединённых к матрице за 1 час, в 2,5 раза выше.

Увеличение концентрации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов также оказывает влияние на синтез полинуклеотида. На рис. 2

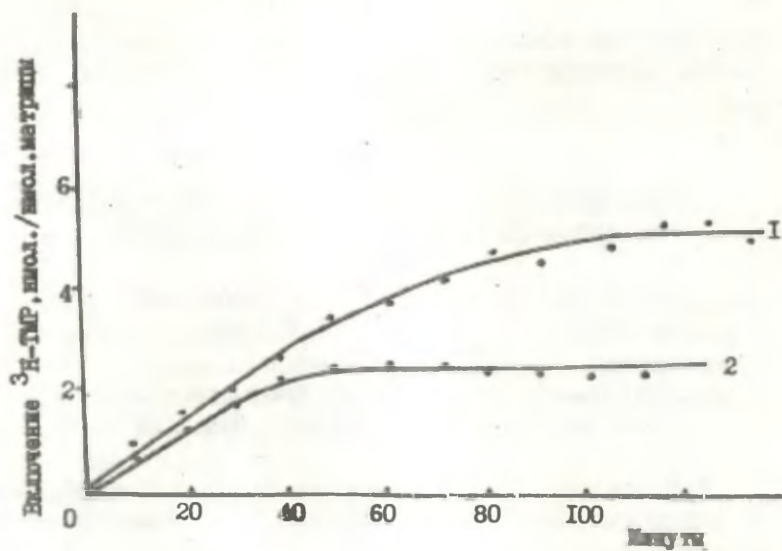


Рис. 1. Кинетика выделения ^3H -ТТР в 50 мМ К-фосфатном буфере /рН 7,3/ /1/ и в 50 мМ трис-НС1 /рН 7,5/ /2/

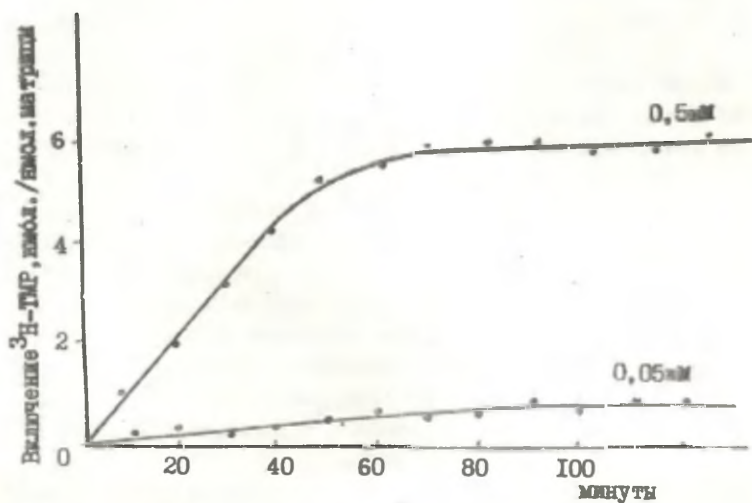


Рис. 2. Кинетика включения ^3H -ТТР при различных концентрациях ТТР.

представлена зависимость выделения ^3H -TMP в полимерную фракцию при двух концентрациях ТТР, 0,05 мМ и 0,05 мМ. Как видно из рис. 2, при увеличении концентрации ТТР в 10 раз степень выделения метки в кислотонерастворимую фракцию также увеличивается в 10 раз, а общая степень утилизации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов не изменяется и составляет 20-30% от исходного количества.

Дальнейшее увеличение концентрации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов не приводит к увеличению выделения ^3H -TMP в полимерную фракцию.

В подобранных условиях синтеза полинуклеотидов были сопоставлены скорости выделения ^3H -TMP и ^{14}C -dAMP в кислотонерастворимую фракцию /рис. 3 /. Как видно из рис. 3, синтез

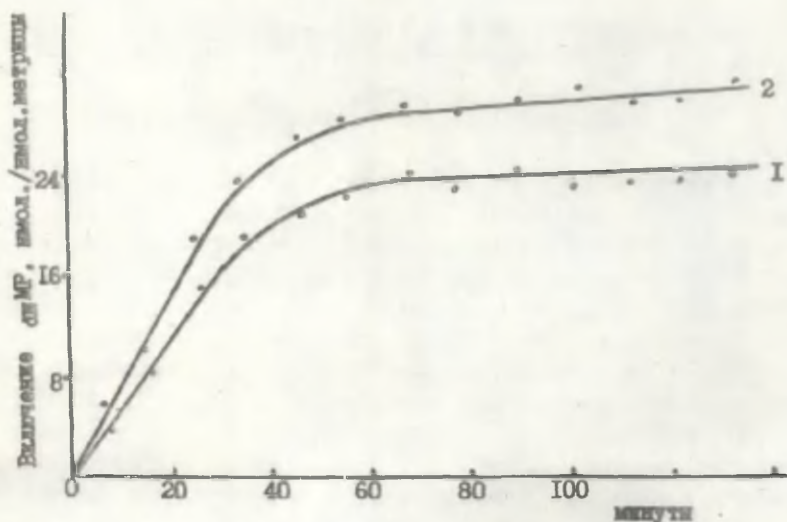


Рис. 3. Кинетика выделения ^3H -TMP /1/ и ^{14}C -dAMP /2/ в dAATTC — поли-A'-dAATTC — поли-T.

поли-dA и поли-T идет одновременно, однако выделение ^3H -TMP в полимерную фракцию несколько ниже, чем ^{14}C -dAMP.

Продукт реакции был проанализирован электрофорезом в 0,75%-ном агарозном геле. Он представляет собой гетерогенный набор двунитевых фрагментов с молекулярными весами около $0,5 \cdot 10^6$ /рис. 4/.

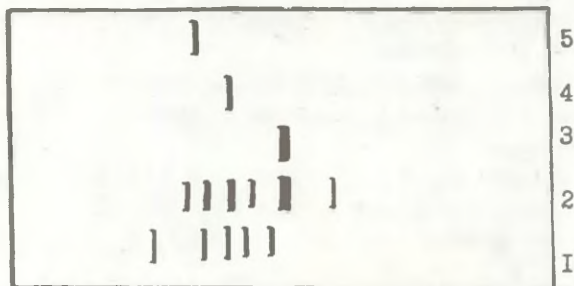


Рис. 4. Электрофорез продуктов полимеризации в 0,75%-ном агарозном геле; I - рестриктаза EcoR1 ДНК λ ; 2 - продукт полимеризации; 3-5 - индивидуальные фрагменты, выделенные из смеси с помощью электрофореза.

Наличие неспаренных 5'-концевых последовательностей в продукте ДНК-полимеразной реакции исследовали, гидролизуя $5' \text{--}^{32}\text{P}\text{--dAATTC}\text{--поли-А}\text{--dAATTC}\text{--поли-Т}$ S1 - нуклеазой. Обнаружено, что 90% радиоактивного материала перешло в кислоторастворимую фракцию и представляет собой dAMP.

Остаток dGMP, необходимый для формирования сайта при встройке в вектор по рестриктазе EcoR1, был добавлен к 3'-концам полинуклеотидов ДНК-полимеразой I E.coli.

Таким образом, можно полагать, что в описанных условиях синтезирован модельный дуплекс, пригодный для встраивания в векторные молекулы. В настоящее время осуществляется получение рекомбинантных молекул с этим дуплексом и изучение экспрессии встроенного фрагмента.

ДАЛЬНЕЙШЕЕ ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ КРУПНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ R-ПЛАЗМИД

Белокрысенко С.С., Самсонова А.П.

2-й Московский государственный медицинский
институт им. Н.И. Пирогова, Москва

R-плазмиды, контролирующие множественную лекарственную устойчивость у клинических штаммов грамотрицательных бактерий, как правило, являются конъюгативными и обладают большим молекулярным весом. Механизм формирования таких плазмид в естественных условиях можно представить как результат обмена плазмидами между членами бактериальных ассоциаций, рекомбинационных событий, включающих законную и незаконную рекомбинацию, и отбора рекомбинантных плазмид с наиболее рациональной структурой. Исследование молекулярной структуры и функций крупных плазмид клинических штаммов позволяет обнаружить результаты действия такого механизма, обозначаемого обычно как эволюция плазмид.

Исследование проведено на 6 плазмидах клинических штаммов семейства кишечных бактерий. Плазмиды несли 4-6 маркеров устойчивости и обладали молекулярным весом 70 - 200 md /определение по электрофоретической подвижности в агарозном геле/ /Таблица/. Плазмидная ДНК, выделенная центрифугированием осветленных лизатов с хлористым цезием в присутствии бромистого этидия, обладала трансформирующей активностью. Во всех 6 случаях частота появления трансформантов зависела от маркеров устойчивости, использованных для отбора. Выход трансформантов при отборе по стрептомицину и ампициллину был на 2-3 порядка выше, чем при отборе по устойчивости к канамицину, тетрациклину и хлорамфениколу. При отборе по устойчивости к канамицину, тетрациклину или хлорамфениколу трансформанты содержали либо целую плазмиду, либо большую ее часть с обязательным присутствием *tra*-генов. При отборе по устойчивости к ампициллину или стрептомицину у трансформантов обнаруживали мелкие неконъюгативные плазмиды, контролирующие,

Таблица

Характеристика R-плазмид клинического происхождения

Плазмиды	Фенотип	Молекулярный вес ($\times 10^6$)	Штамм-носитель
pPI220	TraCmKmTcApSuSm	200	K. pneumoniae PI220
pPI2031	TraKmTcApSuSm	180	K. pneumoniae PI2031
pPI2041	TraCmKmTcApSuSm	90	E. cloacae PI2041
pPI2051	TraKmTcSuSm	70	P.morganii PI2051
pPI8005	TraCmKmTcApSuSm	120	E. coli PI8005
pPI8036	TraCmKmTcApSuSm	120	E. coli PI8036

ж R-плазмиды, определяющие резистентность к хлорамфениколу /Cm /, канамицину /Km /, тетрациклину /Tc /, сульфонидами /Su /, стрептомицину /Sm /; Tra - конъюгативность R-плазмид

соответственно, устойчивость к ампициллину /Ap/, либо - к стрептомицину и сульфаниламидам (SmSu) Независимо от препаратов плазмидной ДНК выделяемые от трансформантов мелкие плазмиды с маркером amp были неразличимы или очень близки по электрофоретической подвижности /молекулярный вес около $7 \cdot 10^6$ /. То же относится и к плазмидам, контролирующим устойчивость к стрептомицину и сульфаниламидам /молекулярный вес около $4 \cdot 10^6$ /.

Более подробно представляются данные о структуре плазмиды pPI220. Делеционная карта плазмиды и ее варианты, полученные при трансформации, представлены на рис. Перенос при трансформации всей плазмиды был редким. Основная масса трансформантов несла мелкие плазмиды с маркерами amp, str, sul или amp, str, sul. Независимо выделенные трансформанты, отобранные по устойчивости к ампициллину или к стрептомицину,

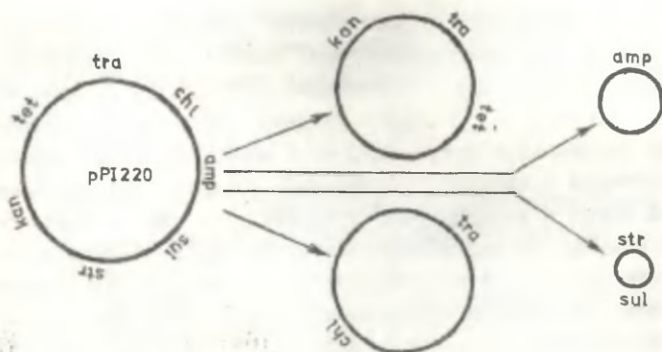


Рис. Делеционная карта плазмиды pPI220 и варианты, наиболее часто обнаруживаемые при трансформации плазмидной ДНК.

несли мелкие, неразличимые по электрофоретической подвижности плазмиды с молекулярным весом, соответственно, 7 мд и 4 мд. Популяция трансформантов с маркерами amp, str, sul оказалась гетерогенной в отношении типов плазмидной ДНК. В трансформантах обнаруживали плазмидную ДНК с молекулярным весом 4 мд, 7 мд и 10 мд. Выделенная ДНК переносила устойчивость к одному ампициллину, стрептомицину и сульфаниламидам или одновременно ко всем трем препаратам.

Полученные результаты говорят, очевидно, против случайной фрагментации ДНК крупных плазмид в процессе трансформации. Речь идет, скорее, о закономерном расщеплении плазмидной ДНК на способные к самостоятельной репликации стандартные фрагменты, которые несут определенные функциональные маркеры и обладают одинаковым /или очень близким/ молекулярным весом. Таким образом, плаزمида pPI220 состоит по крайней мере из трех потенциально независимых репликонов, один из которых включает гены tra с маркерами chl, tet, kan /основная часть плазмиды/, а два других - репликоны с маркерами amp и str, sul небольшого молекулярного веса. Кажется оправданным предположение, что расщепление плазмиды pPI220 при трансформации отражает процесс ее формирования в естественных условиях и обратен этому процессу.

В серии опытов была изучена возможность интеграции выде-

ленных при трансформации компонентов плазмиды pPI220. В штамм *E. coli* C600 были перенесены независимые плазмиды - компоненты pPI220 в двух сочетаниях: 1/ TtaCm+Ap + SmSu и 2/ TtaK^{ts} +Ap +SmSu. В каждом из двух сочетаний плазмиды стабильно сохранялись в клетках. По 5 независимо полученных клонов бактерий с каждым из сочетаний плазмид инкубировали различное время в жидкой среде и проверяли наличие интегрированных плазмид по совместному переносу при конъюгации, ко-трансдукции фагом PI и электрофорезом плазмидной ДНК в агарозном геле. Заметной интеграции изученных независимых репликонов обнаружить не удалось /реже 10^{-3} - 10^{-4} /. Одно из возможных объяснений отрицательного результата состоит в том, что рекомбинационные события при наличии в клетке нескольких плазмид совершаются редко, и для выявления рекомбинантных плазмид необходим отбор.

ИЗУЧЕНИЕ ВЫЩЕПЛЕНИЯ ГОМОЛОГИЧНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК ИЗ ГЕНОМА ГИБРИДНЫХ ФАГОВ λ

Беляев А.С., Гусев В.А.,

Щелкунов С.Н., Малыгин Э.Г.

Специальное конструкторско-техническое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск

При получении гибридов фага λ , имеющих в геноме значительные гомологичные последовательности, примыкающие друг к другу, наблюдается выщепление таких последовательностей. В этих экспериментах нами была использована *E. coli*, не имеющая дефектов в генах системы рекомбинации. В настоящей работе на основе λ gt-0 и индивидуальных фрагментов ДНК фага λ были получены *in vitro* гибридные молекулы ДНК, имеющие примыкающие друг к другу повторяющиеся последовательности. Затем этими гибридными ДНК трансфекцировали *E. coli* ResA⁻ и, исходя из отдельных бляшек, проводили препаративную наработку полученных фагов на том же штамме *E. coli*. С целью выявления роли системы рекомбинации *E. coli* в выщеплении гомо-

логичных последовательностей в фаговом геноме проводится изучение последствий пассирования гибридных фагов на штаммах *E. coli* полноценных и дефектных по системе рекомбинации.

ОБНАРУЖЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК У ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* ПРОДУЦЕНТА ПЕНИЦИЛЛИНАМИДОГИДРОЛАЗЫ

Белькинд А.М., * Гараев М.М., Бартошевич В.Э.

Всесоюзный научно-исследовательский

институт антибиотиков, Москва;

* Институт вирусологии АМН СССР

им. Д.И. Ивановского, Москва

1. Анализ плазмидной ДНК, выделенной из штамма-продуцента пенициллинамидогидролазы *E. coli* W ATCC 9637 методом электрофореза в агарозном геле, показал наличие плазмиды pAB-1 с молекулярным весом 3 мегадальтона.

2. Плазмиды с таким же молекулярным весом обнаружены также в штаммах мутантах *E. coli* W P4, HP68, PPA-3/5, PB-99 и BY-14, а также в штамме NCIB 8743, который также является продуцентом пенициллинамидогидролазы.

3. Котрансформация плазмиды pAB-I с плазмидой RSP2124 штамма *E. coli* K12 C600 $hsd R^-$ $hsd M^-$ позволила выделить котрансформанты, несущие плазмиды RSP2124 и pAB-1 одновременно.

4. Обсуждается возможная роль плазмиды pAB-1 в синтезе пенициллинамидогидролазы штаммами *E. coli*.

ЭКСПРЕССИЯ НАТИВНЫХ ДНК И РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ В СОПРЯЖЕННЫХ СИСТЕМАХ ТРАНСКРИПЦИИ-ТРАНСЛЯЦИИ

Блинов А.Г., Головин С.Я.,
Чесноков В.Н., Мертвецов Н.П.

Специальное конструкторско-технологическое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск

Исследованы возможность и закономерности экспрессии нативных ДНК и их рестрикционных фрагментов в сопряженных системах транскрипции-трансляции *in vitro*. В гомологичной системе транскрипции-трансляции из *E. coli* проведена эффективная экспрессия рестрикционного фрагмента ДНК фага T₇ и ДНК делеционного мутанта фага T₇ с образованием белков, идентичных белкам, программируемым нативной ДНК фага T₇. В гетерологичной системе транскрипции-трансляции с использованием РНК-полимеразы из *E. coli* и бесклеточной системы трансляции из зародышей пшеницы показана возможность экспрессии ДНК вируса ядерного полиэдроса и рестрикционных фрагментов ДНК с образованием белковых продуктов.

Определены размеры полученных белков.

КЛОНИРОВАНИЕ ДНК *CANDIDA UTILIS* В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Бобкова А.Ф., Бобков А.Ф., Гараев М.М.,
Кислина О.С., Зинченко А.И.

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского
АМН СССР, Москва

I. Проведено клонирование суммарного препарата ДНК *C. utilis* с помощью рестрикционной эндонуклеазы BamHI на плазмиде pBR322, детерминирующей устойчивость к тетрациклину и ампициллину. В качестве реципиентного штамма использо-

вали бактерии *E. coli* SK1592 F⁻gal⁻thi⁻Tl⁻endA⁻sbcB15 hsd124 hsd M⁺.

2. Частота появления клонов, несущих гибридные плазмиды, составляла 5% от общего числа ампициллинорезистентных трансформантов.

3. Размер вставки дрожевой ДНК в гибридных плазмидах составлял 0,2-12,0 мегадальтон.

4. С частотой около 0,5% были обнаружены трансформантные клоны, несущие плазмиду с молекулярным весом 1,85 мегадальтон, которая представляет собой делеционный вариант родительской плазмиды pBV322.

5. Анализировалась возможность выражения генов *C. utilis* в бактериях *E. coli*.

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ВЫРАЖЕНИЕ H_2S И F⁺lac ПЛАЗМИД,
ОБНАРУЖЕННЫХ В ШТАММЕ CITROBACTER FREUNDII,
ВЫДЕЛЕННОМ ОТ БОЛЬНОГО ДИАРРЕЕЙ

Бондаренко В.М., Тимофеева И.Т.
Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Известно, что бактерии трибы Salmonellae, включающей по Ewing /1973/ роды Salmonella, Arizona и Citrobacter, как правило, обладают способностью образовывать сероводород.

В настоящее время рядом исследователей описаны штаммы сальмонелл, обладающими Lac⁻, Sac⁻, Raf-плазмидами, передающие соответствующие признаки с различной частотой эшерихиям, сальмонеллам и другим бактериям семейства кишечных /Le Minor et al., 1973, Smith, Parsell, 1975, Петровская и др., 1975, 1977/.

Плазмидный характер контроля признака сероводородообразования установлен только в отношении эшерихий, все представители рода которого являются сероводородонегативными (Ørskov, Ørskov, 1973).

Показано подавление признака сероводородообразования у штаммов сальмонелл, приобретших в эксперименте плазмиду $F^{+}lac$ /Домбровский, Сержантова, 1978/.

Нами изучено фенотипическое проявление признаков, детерминируемых плазмидами H_2S и $F^{+}lac$ одновременно обнаруженных в диком штамме *S. freundii* 4338 серогруппы O13, выделенном от больного с острой кишечной инфекцией. Штамм по совокупности признаков соответствовал таксономической характеристике, определенной для бактерий рода *Citrobacter*, на средах Эндо, Левина и Плоскирева образовывал лактозонегативные колонии, был H_2S^{-} .

Плазмида H_2S у штамма *S. freundii* была обнаружена нами при изучении трансконъюгантов, полученных в эксперименте с использованием системы тройного скрещивания, включающей промежуточный *E. coli* C600 Ap^r (RSF 2124) и конечный *E. coli* K12 200 PS Rif^r реципиенты, любезно переданные нам А.Л. Табачник /Институт вакцин и сывороток им. Мечникова/.

Изучение первичной генетической характеристики трансконъюгантов *E. coli* K12 200 показало, что все отобранные клоны, в отличие от донорского дикого штамма *S. freundii* не росли на среде с цитратом натрия и обладали нетрансмиссивной плазмидой RSF 2124.

Наше внимание обратило то, что только часть /80%/ трансконъюгантов *E. coli* K12 200 PS на среде Олькеницкого характеризовалась способностью образовывать сероводород. Отсутствие сероводородообразования у 20% клонов могло быть объяснено явлением сегрегации фактора передачи и маркера H_2S .

Дальнейшие исследования показали, что на минимальной среде с лактозой в качестве единственного источника углерода бактерии исходного штамма *S. freundii* вырастают на вторые сутки инкубации. Последнее указывало на способность цитробактера утилизировать лактозу.

В серии последующих скрещиваний нам удалось показать не только сегрегацию признаков, но и наличие у трансконъюгантов *E. coli* K12 одной плазмиды H_2S , плазмиды $F^{+}lac$ или одновременное наличие в клетке обеих указанных плазмид. Часть $H_2S^{+}F^{+}lac^{+}$ штаммов замедленно ферментировала лактозу.

Следует отметить, что родительский штамм *O. freundii* 4338 013 был нечувствителен к донорспецифическому фагу MS2, в то время как H_2S и $F'lac$ трансконъюганты *E. coli* K12 200 RS приобретали способность лизироваться указанным фагом.

Данные, полученные нами при изучении генетически связанных трансконъюгантов *E. coli* K12 200 RS, позволили таким образом показать, что подавление признака ферментации лактозы у дикого штамма *S. freundii*, несущего плазмиду $F'lac$, связано с наличием у бактерий одновременно и плазмиды H_2S .

КАРТЫ РАВНОВЕСНОГО ПЛАВЛЕНИЯ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ МЕСТ ПОСАДКИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ НА ДНК ПЛАЗМИДЫ ColE1

Боровик А.С., *Каламбет Ю.А., Любченко Ю.Л.,

Черный Д.И., Шитов В.Т.

Институт молекулярной генетики, АН СССР, Москва

*Московский физико-химический институт, Москва

Особенности распределения нуклеотидных пар определяют характер плавления молекулы ДНК. Выплавление участков с относительно однородным нуклеотидным составом происходит кооперативно, в узком температурном интервале и проявляется в виде характерных ступеней на кривой плавления. Тонкая структура кривой плавления особенно отчетливо выявляется в виде пиков на дифференциальной кривой плавления /ДКП/ (Lyubchenko et al., 1976).

ДКП плазмиды ColE1 содержит 8 ярко выраженных пиков, отвечающих кооперативному выплавлению участков ДНК /рис. I / /Исследовались линейные молекулы, полученные расщеплением исходной суперскрученной ДНК эндонуклеазами рестрикции EcoRI или SmaI. По разработанной ранее методике (Pavlov et al., 1977) с помощью глиоксаля были зафиксированы расплавленные участки на ДНК при температурах внутри интервала плавления. Частично денатурированные молекулы визуализировались с помощью электронной микроскопии.

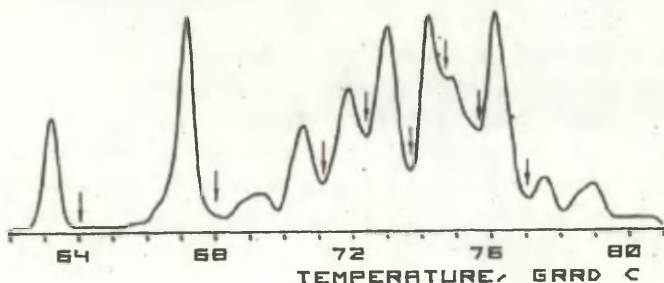


Рис. 1. Дифференциальная кривая плавления ДНК плазмиды ColE1. Стрелками отмечены температуры фиксации частично денатурированных молекул

Построена серия денатурационных карт, отвечающих различным степеням денатурации /рис. 2 /, что позволило локализовать на молекуле участки, выплавление которых соответствует пикам ДКП, и тем самым визуализировать процесс равновесного теплового плавления.

Такой метод построения денатурационных карт позволил не только локализовать местоположение легкоплавких районов генома, но и определить усредненный нуклеотидный состав участков ДНК протяженностью 150 ± 300 пар нуклеотидов.

Построение денатурационных карт фрагментов, получающихся при совместном действии рестриктаз EcoR1 и Sma1, дало возможность ориентировать карту распределения ГЦ-пар относительно функциональной карты плазмиды ColE1 (Dougan et al., 1978).

С помощью электронной микроскопии построены также карты мест посадки молекул РНК-полимеразы *E. coli* на геноме ColE1 при различных молярных соотношениях фермента и ДНК. При небольших количествах фермента связывание происходит в основном в промоторных участках, расположенных в районе ДНК, наиболее обогащенном АТ-парами /рис. 3а/. Увеличение молярной концентрации приводит к увеличению числа молекул РНК-полимеразы, связывающихся в неспецифических местах. Сопоставление

карты неспецифической посадки РНК-полимеразы на ДНК с картой распределения ГЦ-пар показывает, что число молекул фермента, связанных на участке ДНК коррелирует с его нуклеотидным составом.

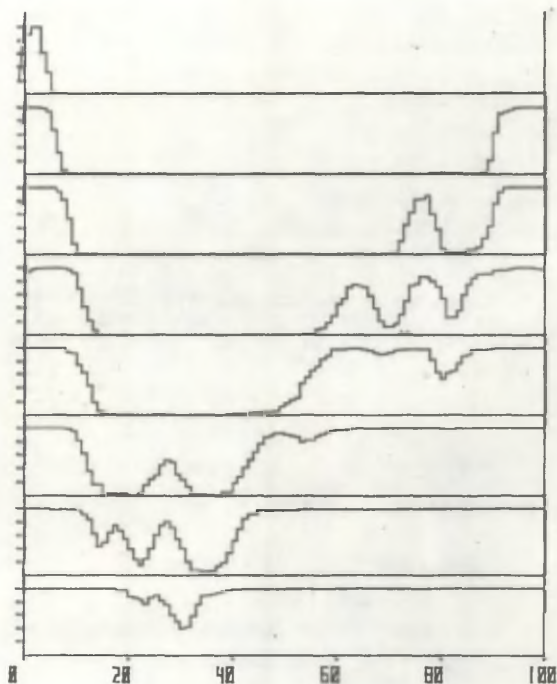


Рис. 2. Серия денатурационных карт, соответствующих различным стадиям плавления молекул ДНК ColE1. Сайт расщепления рестриктазой SmaI находится на расстоянии 81.4 от левого конца

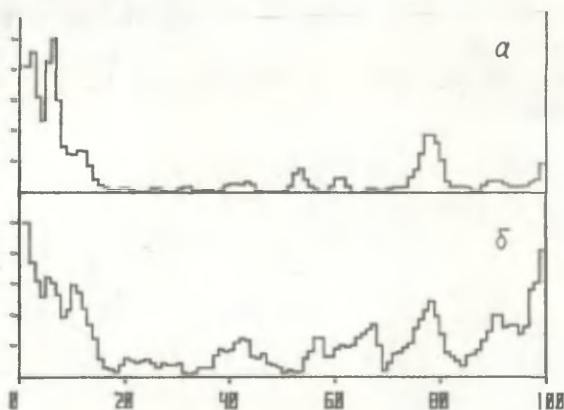


Рис. 3. Карты мест посадки молекул РНК-полимеразы на ДНК ColE1 при молярном отношении фермент/ДНК равном 9 /рис.3а / и 18 /рис.3б/

ХАРАКТЕРИСТИКА И ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ПЛАЗМИД У КЛИНИЧЕСКОГО ШТАММА *E. COLI* P12010

Бочканов С.С., Самсонова А.П.,
Белокрысенко С.С.

2-ой Московский государственный медицинский
институт им. Н.И. Пирогова, Москва

Исследованный штамм *E. coli* P12010 выделен от больных токсическим энтероколитом в отделении для новорожденных, а также из крови у двух больных. Штамм отнесен к патогенному серовару O20, имел ауксотрофность по фенилаланину и был устойчив к канамицину, ампициллину, стрептомицину, тетрациклину и налидиксовой кислоте. Особенностью штамма оказалось разнообразие генетических элементов, контролирующих лекарственную устойчивость. Эксперименты по переносу лекарственной устойчивости при конъюгации, результаты трансформации плазмидной ДНК и ее разделение электрофорезом в агарозном геле показыва-

ли присутствие в штамме *E. coli* PI2010 трех плазмид: конъюгативной плазмиды pPI2010 с молекулярным весом около 100 Md контролирующей устойчивость к канамицину, неконъюгативной плазмиды pPI2011 с молекулярным весом около 7 Md контролирующей устойчивость к ампициллину, неконъюгативной плазмиды pPI2012 с молекулярным весом 4 Md и маркером устойчивости к стрептомицину. Маркер устойчивости к тетрациклину не удалось связать ни с одной из плазмид, присутствующих в штамме. Ряд косвенных данных позволяет предположить его локализацию в составе транспозона на бактериальной хромосоме.

Суммарная плазмидная ДНК из штамма *E. coli* PI2010 обладала трансформирующей активностью в отношении реципиентных штаммов *E. coli* K12. Каждая из плазмид передавалась при трансформации независимо, и выделенные трансформанты были использованы для дальнейшего функционального изучения плазмид и получения ДНК отдельных плазмид.

В скрещивании *E. coli* PI2010 с реципиентными штаммами *E. coli* K12 частота переноса конъюгативной канамициновой плазмиды составляла за ночь 5×10^{-2} . В 5% случаев одновременно с устойчивостью к канамицину трансконъюганты приобретали устойчивость к ампициллину. Исследование плазмидной ДНК показало, что в этом случае трансконъюганты содержат две физически независимые плазмиды, контролирующие каждый из видов устойчивости - pPI2010 и pPI2011. Ампициллиновая плаزمида pPI2011 не является конъюгативной, однако легко мобилизуется конъюгативной плазмидой pPI2010 в исходном штамме, а также в штаммах *E. coli* K12, когда эти плазмиды находятся вместе.

Стрептомициновая плазмида pPI2012 неконъюгативна и не мобилизуется плазмидой pPI2010 как в исходном штамме, так и в штаммах *E. coli* K12. Единственный наблюдавшийся случай переноса стрептомицинового маркера при конъюгации /реже 10^{-10} / произошел в результате интеграции - в составе плазмиды pPI2010.

Устойчивость к тетрациклину не передается при трансформации суммарной плазмидной ДНК, выделенной из *E. coli* PI2010. Тем не менее маркер устойчивости к тетрациклину обнаружива-

ется у трансконъюгантов с частотой около 10^{-8} . Во всех случаях переноса тетрациклиновый маркер у трансконъюгантов оказывался в составе канамициновой плазмиды **pPI2010**. Плазмида **pPI2010** с интегрированным тетрациклиновым маркером переносила его одновременно с устойчивостью к канамицину при конъюгации или при трансформации изолированной ДНК. Включение тетрациклинового маркера в плазмиду **pPI2010** в каждом отдельном случае могло не отражаться на конъюгативности, снижать эффективность переноса плазмиды при конъюгации до $1 - 0,1\%$ от исходной или превращать плазмиду в неконъюгативную. Это, вероятно, свидетельствует о существовании на плазмиде **pPI2010** нескольких сайтов интеграции тетрациклинового маркера.

Данные в пользу предположения о хромосомной локализации тетрациклинового маркера у штамма *E. coli* **PI2010** были получены в скрещивании *E. coli* **Hfr KS750** x *E. coli* **PI2010**, в которых штамм *E. coli* **PI2010** был реципиентом. Отбор рекомбинантов вели по проксимальному для **Hfr** штамма маркеру **rpsL (strA)**. Около 1% рекомбинантов, получивших от штамма *E. coli* **Hfr KS750** хромосомный маркер **rpsL** теряли устойчивость к тетрациклину. Устойчивость к канамицину и ампициллину у всех рекомбинантов сохранялась.

Сводные данные о генетическом контроле различных видов устойчивости у штамма *E. coli* **PI2010**, свойствах плазмид и отдельных маркеров устойчивости представлены в таблице.

Если дополнительная проверка подтвердит все представленные данные, то штамм *E. coli* **PI2010** окажется своеобразной демонстрацией бактериальных возможностей в приобретении лекарственной устойчивости. Отдельные виды устойчивости у этого штамма контролируются а/ крупной конъюгативной плазмидой (**Km**), б/ мелкой неконъюгативной, но мобилизуемой плазмидой (**Ap**), в/ мелкой неконъюгативной и немобилизуемой плазмидой (**Sm**), г/ транспозоном, расположенным на хромосоме (**Tc**) и д/ хромосомным геном (**nal**).

Таблица
Свойства R-плазмид и отдельных маркеров устойчивости
у штамма *E. coli* PI2010

Признаки устойчивости	Плазмидный контроль			Свойства маркеров	
	плазмиды	конъюгативность	мобилизуемость	выщепление в скрещивании с донором Hfr	свойства транспозона
Km	pPI2010.. 100 Md	+		-	+
Ap	pPI2011 7 Md	-	+	-	не изучены
Sm	pPI2012 4 Md	-	-	-	не изучены
Tc	-			+	+/?/
Nal	-			+	-

ВЫРАЖЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ ПЛАЗМИДЫ **KP4**, ПЕРЕДАННОЙ
ОТ *E. COLI* ПРИРОДНЫМ ШТАММАМ *PSEUDOMONAS*

Былинский А.Ф., Гриц Н.В.,
Белявский К.М., Максимова Н.П.
Белорусский государственный университет
им. В.И. Ленина, Минск

В последнее время бактерии рода *Pseudomonas* становятся одним из наиболее широко используемых объектов исследований. Возросший интерес к представителям данного рода обусловлен рядом причин, к числу которых относится возможность использования отдельных штаммов в качестве продуцентов биологически активных веществ и утилизаторов различных промышленных отходов.

Независимо от конкретной цели применения штаммов *Pseudomonas*, существенную ценность представляют те из них, которые обладают способностью воспринимать и стабильно наследо-

вать чужеродный генетический материал, что позволяет экспериментально создавать новые штаммы с необходимым набором свойств.

Целью настоящей работы было выявление среди 515 штаммов *Pseudomonas* spp., выделенных из различных природных источников и имеющихся в коллекции Проблемной НИЛ экспериментальной биологии БГУ им. В.И. Ленина, штаммов-реципиентов, способных эффективно воспринимать плазмиду RP4, и изучение выражения и стабильности наследования детерминант антибиотикорезистентности, входящих в состав указанной плазмиды.

В предварительной серии экспериментов была изучена чувствительность всех штаммов *Pseudomonas* к действию тетрациклина, канамицина и неомицина, что позволило подобрать условия селекции трансконъюгантов скрещивания *E. coli* x *Pseudomonas*, а также контролировать в последующем выражение и стабильность воспринятых детерминант плазмиды RP4.

Оказалось, что из 515 штаммов, идентифицированных и отнесенных к роду *Pseudomonas*, 151 штамм обладает способностью воспринимать плазмиду RP4 в гетерологичных скрещиваниях. Эффективность передачи *tot* маркера RP4 в бактерии *Pseudomonas* представлена в таблице I /конъюгативность плазмиды RP4 в скрещиваниях штаммов *E. coli* C600 x J62 составляла 5×10^{-3} /.

Таблица I

Распределение реципиентных бактерий *Pseudomonas* по частоте восприятия плазмиды RP4 при конъюгации с *E. coli* C600

Частота формирования Tc^r -трансконъюгантов	10^{-2} - 10^{-3}	10^{-4} - 10^{-5}	10^{-6} - 10^{-7}
Число штаммов	47	48	56

У 82 штаммов *Pseudomonas*, воспринявших плазмиду RP4 с частотой 10^{-2} - 10^{-4} , были определены максимальные уровни приобретенной устойчивости к тетрациклину, канамицину и неомицину. В результате установлено, что, примерно, у половины изученных штаммов гены антибиотикорезистентности выражаются одинаково эффективно /табл. 2/.

Таблица 2
Выражение плазмиды RP4 в бактериях различных
штаммов *Pseudomonas* spp.

№ п/п	Тип антибиотикорезистентности	Число штаммов	%
1	Tc ^r Km ^r Nm ^r 400	42	51,2
2	Tc ^r 200Km ^r 400Nm ^r 400	7	8,5
3	Tc ^r 400Km ^r 400Nm ^r 100	6	7,3
4	Tc ^r 400Km ^r 200Nm ^r 400	4	4,9
5	Tc ^r 200Km ^r 200Nm ^r 20	3	3,7
6	Tc ^r 400Km ^r 200Nm ^r 200	3	3,7
7	Tc ^r 400Km ^r 100Nm ^r 50	3	3,7
8	Tc ^r 400Km ^r 200Nm ^r 100	2	2,4
9	Tc ^r 200Km ^r 200Nm ^r 50	2	2,4
10	Tc ^r 200Km ^r 100Nm ^r 20	2	2,4
	Другие типы	8	9,6

Методом клонального анализа у 22 штаммов *Pseudomonas*, воспринявших плазмиду RP4, изучена стабильность наследования генов антибиотикоустойчивости. Установлено, что 9 штаммов наследуют плазмиду RP4 стабильно. У двух штаммов наблюдалась сегрегация клеток, утративших все плазмидные маркеры. В остальных случаях регистрировалась либо утрата плазмидных генов /у 7 штаммов/, либо потеря как отдельных маркеров, так и всей плазмиды целиком /табл. 3 /.

Таблица 3
Стабильность наследования плазмиды RP4 бактериями
Pseudomonas

№ п/п	Исследуемые маркеры	Частота выявления %/	Число штаммов
I	2	3	4
1	Tc Km Nm	100	9
2	Tc Km Nm	44,3 - 78,7	6
	Tc Km -	21,3 - 55,7	
3	Tc Km Nm	77,3 - 99,4	2
	- - -	0,6 - 22,7	

Продолжение таблицы 3

I	2	3	4
4	Tc Km Nm	53,7	I
	Tc Km -	44,3	
	Tc - -	1,4	
5	Tc Km Nm	92,0	I
	Tc Km -	4,4	
	- - -	3,6	
6	Tc Km Nm	96,2	I
	Tc - -	0,8	
	- - -	3,0	
7	Tc Km Nm	6,0	I
	- Km -	77,7	
	- - -	16,3	
8	Tc Km Nm	21,2	I
	Tc Km -	70,0	
	- - -	1,4	
	Tc - -	7,4	

Таким образом, из полученных результатов следует, что значительная часть штаммов *Pseudomonas*, выделенных из природных источников, способны участвовать в процессе бактериальной конъюгации и эффективно воспринимать и наследовать плазмиду RF4 в дерепрессированном состоянии.

РЕКОМБИНАЦИЯ R И R' ПЛАЗМИД, НЕСУЩИХ ТРАНСПОЗОН УСТОЙЧИВОСТИ К ТЕТРАЦИКЛИНУ, В ШТАММАХ *ESCHERICHIA COLI* K12

Веревкин В.В., Чернин Л.С.

Институт химической физики АН СССР, Москва

С частотой 5×10^5 осуществлена передача транспозона Tn10, детерминирующего устойчивость к тетрациклину, в мультикопийную конъюгативную плазмиду R6K (Ap Sm). Отобраны производные R6K: :Tn10, плазмиды pVC1 и pVC41, утратившие маркер str, совместимые с исходной плазмидой R6K и реплицирующиеся в отличие от R6K под строгим контролем. По данным центрифугирования в градиентах сахарозы и электронной микроскопии

плазмиды pVC1 и pVC41 имеют молекулярный вес около 35 Md. Предполагается, что обе плазмиды несут одновременно две вставки Tn10 в областях плазмиды R6K, где расположены гены ответственные за устойчивость к стрептомицину, копияность и несовместимость плазмиды. Плазмиды pVC1 и pVC41 переданы конъюгацией в штамм RecA⁻, несущий термочувствительную по репликации плазмиду F_{ts114}lac::Tn10. Полученные двухплазмидные штаммы с частотой 10⁻³ - 10⁻⁴ образуют при 43°C клоны с фенотипом Ap, Tc, Lac⁺, что в 20-100 раз превышает частоту формирования таких клонов штаммом RecA⁻, несущим плазмиды R6K и F_{ts114}lac::Tn10. Показано, что высокая частота появления этих клонов в штаммах, несущих две плазмиды - pVC1 либо pVC41 - и плазмиду F_{ts114}lac::Tn10 связана с формированием гибридных плазмид. Исследованы свойства двух таких гибридов pVC148 и pVC188. Оба гибрида относительно стабильны, термоустойчивы по репликации и передаются при скрещивании в виде одной группы сцепления. Получены данные о том, что по крайней мере при повышенной температуре гибридные плазмиды pVC148 и pVC188 реплицируются под контролем плазмид pVC1 и pVC41, соответственно. Обсуждается применимость предложенного метода конструирования гибридных плазмид *in vivo* для избирательного клонирования и амплификации генов бактериальной хромосомы.

ФИЗИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА ТОЛ-ПЛАЗМИДЫ pWWO

Виллемс Р.Л.-Э., *Хейнару А.Л., *Хабихт Я.К.

Институт физики АН ЭССР, Тарту;

*Тартуский госуниверситет, Тарту

Несмотря на то, что первая ТОЛ-плазмида pWWO была открыта недавно /Williams, Worsey, 1974/, уже составлена физическая карта этой крупной плазмиды /M = 118 кв/ и найдено расположение многих плазмидоспецифических генов /рис./. Эти молекулярно-биологические исследования проведены, в основном, исследователями группы др. П. Броды в Эдинбургском универси-

тете совместно исследователями Тартуского госуниверситета и Института физики АН ЭССР (Bayley et al., 1977; Villema et al., 1978; Heinaga et al., 1978; Downing et al., 1979; Downing, Broda, 1979).

Анализ спонтанных делеционных мутантов TOL-плазмиды типа pFWO-8 и полученных при помощи транспозона Tn401 плазмиды типа pWWO выявляют, что TOL-специфические гены захватывают участок ДНК с молекулярным весом не более 40 кв, хотя, в отдельных случаях, они достигали до 52 кв. Все выше-названные делеционные мутанты плазмиды pWWO остались трансмиссивными (tra^+). Ряд изученных штаммов получен от др. П. Виллиамса, П. Броды, А. Чакрабарты, Б. Холловей, за что авторы им искренне благодарны.

Нами был изучен также делеционный мутант TOL-плазмиды TOL* (Chakrabarty et al., 1978), имеющий делецию около 18 кв в области *tra*. Рестрикционный анализ с рестриктазами EcoRI, HindIII и XhoI показал, что эта делеция не перекрывает делеции, захватывающих TOL-специфический район этой плазмиды /рис./.

Эти исследования являлись первым доказательством в пользу того, что составленная ранее физическая карта плазмиды pWWO с помощью рестриктаз HindIII и XhoI является правильной.

В опытах по мобилизации нетрансмиссивной TOL*-плазмиды с помощью трансмиссивных плазмид RPI и R68.44 группы несовместимости P-I нам удалось получить TOL⁺BP1 и TOL⁺R68.44 рекомбинанты с реципиентным штаммом *Ps. putida* 340 *trp, str-r* с очень низкой частотой /около 10^{-10} /. При этом рекомбинация между TOL⁺ и R-плазмидами не происходила. Кроме того, эти рекомбинанты были нестабильными и TOL* и RPI или R68.44 плазмиды несовместимыми. TOL-плазида pWWO относится к группе несовместимости P-8 и является совместимой с плазмидами группы P-I. Следовательно, можно предполагать, что делеция в плазмиде TOL* захватывает ген или гены, ответственные за свойства несовместимости. Молекулярно-биологические исследования полученных другими исследователями TOL-RP4-плазмид, где происходит встраивание участка TOL-плазмидами с молекулярным весом около 57 кв в RP4-плазмиду, позволяет

выяснить места рекомбинации в TOL-плазмиде, а также расположение гомологичной последовательности для всех плазмид биодеградации в составе TOL-плазмид.



Рис. Ориентировочная физическая и генетическая карта TOL - плазмиды pWWO. Молекулярный вес рестрикционных фрагментов с рестриктазами HindIII и XhoI даны в килобаз; inc P-8 - гены группы несовместимости P-8; tra - гены, определяющие трансмиссивность плазмиды; Tn401 - транспозон 401.

ДЕЛЕЦИОННЫЕ РЕВЕРТАНТЫ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ
ПО ПОДДЕРЖАНИЮ ПЛАЗМИДЫ $pEG1$ ($RP4-ts1$)

Воложанцев Н.В., Степаншин Ю.Г.,

Данилевич В.Н., Амосенко Ф.А.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
антибиотиков, Москва

Изучение фенотипических термореверантов фактора $pEG1$ - температурочувствительного по поддержанию канамицинчувствительного производного R-фактора $RP4 IncRApKmTc$ - показало, что определенная часть из них представляет собой варианты, утратившие ампициллиновый маркер. Частота появления Ap^S -производных $pEG1$ не зависит от активного продукта гена $resA$ и составляет величину около 5×10^{-7} .

Генетически и микробиологически изучены свойства 28 таких производных $/pRP$ плазмид/, полученных из 13 независимых клонов Res^+ и $ResA^-$ штаммов *E.coli* K12, несущих фактор $pEG1$.

Все исследованные pRP плазмиды являются конъюгативными и придают несущим их бактериям устойчивость к тетрациклину и чувствительность к фагам $PRR1$ и $PRD1$. Они стабильно поддерживаются в бактериях, размножающихся при 37° / частота удаления плазмид $< 0,2\%$. При изучении поведения Ap^S -производных в бактериях, размножающихся при 43° , были выявлены два основных класса pRP плазмид.

Представители первой группы являются термостабильными /частота потери плазмидных маркеров клетками, размножающимися на полноценной среде при 43° , не превышает 50% / и не ингибируют, в отличие от исходного ts -мутанта, рост клеток-хозяев при 43° . По данным электрофоретического и электронномикроскопического анализов плазмиды этого класса образуются в результате делеций генома фактора $pEG1$, размер которых составляет 5-8 Md.

Представители второго класса Ap^S -производных в значительной степени сохраняют способность удаляться из клеток в

условиях роста на полноценной питательной среде при 43°: частота удаления плазмид составляет 80-98% /удаление плазмиды pEG1 происходит в этих условиях более чем в 99,5% клеток бактериальной популяции/. pRR плазмиды этого класса, подобно фактору pEG1 , сильно ингибируют рост бактериальных клеток. Электрофоретический и электронномикроскопический анализы ДНК плазмид этой группы показали, что некоторые из них являются делеционными мутантами /размер делеций при этом составляет 3-4 Мд, в то время как другие не обнаруживают отличий по сравнению с плазмидой pEG1 .

Генетический анализ терморевертантов фактора pEG1 , сохранивших маркер amp и образующихся с частотой 1×10^{-5} , показал, что они стабильно поддерживаются в клетках при 43° и не ингибируют рост клеток-хозяев. По данным рестрикционного анализа Ap -реверанты не имеют делеций фрагментов ДНК.

Одновременная утрата ts -зависимого характера репликации и способности ингибировать рост бактериальных клеток, присутствующих фактору pEG1 , у Ap - и делеционных Ap^S - терморевертантов I-го класса указывает на то, что эти два признака, вероятно, детерминированы одним и тем же геном, и что этот ген не является существенным для поддержания плазмиды.

С помощью рестрикционного и гетродуплексного анализов проведено картирование делеций у некоторых делеционных ревертантов. У всех исследованных плазмид делеции полностью захватывают ампициллиновый транспозон Tn1 и локализуются в области от 37,5 до 7,6 Мд карты RF4 / за начало отсчета принята точка 0/38 Мд, соответствующая участку узнавания рестриктазы EcoR1 /.

Область перекрывания делеций у ревертантов, потерявших способность ингибировать рост бактериальных клеток, имеет координаты 2,3-6,5 Мд. Большую часть этого участка занимает транспозон Tn1 /его координаты 3,2-6,2 Мд/. Принимая во внимание тот факт, что у одного из ревертантов 2-го класса /сохранившего способность к значительной остаточной элиминации из клеток при 43° и ингибирующего рост бактерий-хозяев/ делетирован фрагмент ДНК с координатами 3,1-6,5 Мд, естественно предположить, что ген, определяющий ts -зависимый

характер поддержания плазмиды $pEG1$, расположен в непосредственной близости /менее 1 Md от ампициллинового транспозона, на участке ДНК с координатами 2,3 - 3,1 Md карты $KP4$.

Набор делеционных производных, полученных на основе мутанта $KP4$ с термочувствительным дефектом репликации, может быть использован для выяснения вопроса о природе гена, несущего ts - мутацию и для картирования других генов $KP4$.

АМИНОГЛИКОЗИД-3'-ФОСФОТРАНСФЕРАЗЫ, ДЕТЕРМИНИРУЕМЫЕ ТРАНСПОЗОНАМИ $Tn601$ И $Tn5$

Ганелин В.Л., Денисов А.А.,
Сазыкин Д.О., Навашин С.М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков,
Москва

Плазмиды $R6$ и $JR67$ несут Km -транспозоны / $Tn601$ и $Tn5$, соответственно/, различающиеся размерами участка петли / $\sim 1,05 \text{ kb}$ и $\sim 2,3 \text{ kb}$, соответственно/ и размерами IS -элементов (Berg et al., 1975). Эти Km -транспозоны определяют синтез аминогликозид-3'-фосфотрансфераз I и II, соответственно, катализирующих инактивацию канамицина и некоторых других аминогликозидов /неомицина, паромомицина, рибостамицина/. Аминогликозид-3'-фосфотрансферазы I и II были выделены и очищены до гомогенного состояния из клеток *E.coli* CSH2 $R6$ и $W677 JR67$. С помощью различных методов был определен молекулярный вес этих ферментов, а также изучен их аминокислотный состав и другие свойства. Оказалось, что аминогликозид-3'-фосфотрансфераза I, продукт Km -транспозона $Tn601$, имеет молекулярный вес около 36000 /по данным ультрацентрифугирования, гель-фильтрации и электрофореза/ и содержит около 320 аминокислотных остатков, тогда как аминогликозид-3'-фосфотрансфераза II, продукт Km -транспозона $Tn5$, имеет молекулярный вес 26000 и содержит около 240 аминокислотных остатков. Таким образом, протяженность структурного гена для аминогликозид-3'-фосфотрансферазы II / $\sim 0,7 \text{ kb}$ / много меньше,

чем размер петли транспозона Tn5, тогда как размер петли транспозона Tn601 практически полностью соответствует структурному гену для аминокликозид-3-фосфотрансферазы I /~ I,0 кб/. Недавно было показано, что в составе петли транспозона Tn3 (Heffron et al., 1977) и транспозона Tn5 (Meyer et al., 1979) могут располагаться гены, ответственные за нормальную транспозицию указанных транспозонов. Полученные нами данные предполагают, что транспозиция транспозона Tn601, если структурный ген для аминокликозид-3-фосфотрансферазы I целиком лежит в области петли этого транспозона не может контролироваться генами, расположенными внутри петли транспозона Tn601.

АНИОННЫЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА КАК ИНГИБИТОРЫ ПЕРЕДАЧИ КОНЬЮГАТИВНЫХ R И H₁ ПЛАЗМИД

Глатман Л.И., Мороз А.Ф., *Афиногенов Г.Е.,
Яблокова М.Б., **Тягуненко Ю.В.

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи, Москва;

*Научно-исследовательский институт травматологии
и ортопедии им. Р.Р. Вредена, Ленинград;

**Медицинская Академия наук, София, БНР

Изыскание ингибиторов конъюгационного переноса R и других конъюгативных плазмид является одним из возможных подходов к ограничению их распространения. Кроме того, увеличение набора ингибиторов может способствовать выяснению механизмов самого конъюгационного процесса.

В наших предыдущих исследованиях было показано, что анионные поверхностно-активные вещества эффективно подавляют конъюгационную и трансдукционную передачу R плазмид на модели *E. coli* и *Proteus mirabilis*.

Далее было изучено действие анионных детергентов суль-

фонола НП-3, сульфанола-полимера 40I и алкилсульфата натрия на конъюгационную передачу Hly плазмиды от донорского штамма E. coli 212 реципиенту E. coli J53 NaI после 1,3 и 2-х часов конъюгации.

Было показано, что изученные детергенты в концентрациях 250, 500 и 1000 мкг/мл вызывают полное подавление передачи Hly - плазмиды, не изменяя числа жизнеспособных клеток донора и реципиента.

Элиминирующая способность у сульфанола НП-3 и алкилсульфата натрия в отношении Hly плазмиды в условиях наших экспериментов выявлена не была: при проверке 1000 колоний E. coli J53 Hly⁺ и E.coli 212 Hly⁺ после 24, 48 и 72 часов инкубации с данными веществами утрата гемолитической активности отмечалась лишь у одной колонии.

Было показано также, что наличие как Hly, так и R плазмид практически не изменяет скорости размножения штамма E. coli J53 в присутствии изученных соединений.

Механизм антиконъюгационного действия сульфанола НП-3 был выяснен на модели R-передачи на штаммах E. coli J53 (RI-16 и E. coli C600.

Было изучено влияние детергента на различные стадии процесса, а также на донорскую и реципиентную активность. Этап конъюгации, наиболее чувствительный к действию вещества, был выявлен в опытах с разведением конъюгационной смеси в 10^4 раза после импульсной /5-10-минутной/ конъюгации и добавлением сульфанола НП-3 в различные моменты конъюгации. В экспериментах этой серии было показано, что детергент подавляет ранний этап конъюгации - образование специфических пар или групп, практически не действуя на более поздние стадии процесса. Изменения донорской и реципиентной активности не было отмечено ни в условиях кратковременного /30-минутного/, ни длительного /18-часового/ воздействия на штаммы донора и реципиента с последующим отмыванием вещества перед скрещиванием.

Следует отметить, что сульфанола оказывает ингибирующий эффект в концентрациях существенно меньших, чем бактериостатические. ЕД₅₀ /доза, вызывающая уменьшение трансконъюгантов

на 50% по сравнению с контролем/, определенная путем пробит-анализа кривых доза-эффект, составляла 36,6 мкг/мл. ЕД_{0,01} и ЕД_{99,99} равнялись 4,9 и 27,35 соответственно.

Ингибирующее действие сульфанола НП-3 на R-передачу было подтверждено в опытах *in vivo* на модели конъюгационной передачи плазмиды RI *drd* в кишечнике мышей-гнотобионтов Swiss Webster. В пробах фекалий мышей, получивших 2500 мкг сульфанола непосредственно перед введением реципиентного штамма E. coli J62, трансконъюганты полностью отсутствовали. В то же время число жизнеспособных клеток донора и реципиента не было уменьшено по сравнению с контролем. Частота передачи *pro donor* у контрольных мышей составляла 10^{-3} - 10^{-4} .

ВНЕХРОМОСОМНАЯ ПРИРОДА ФАКТОРА ВИРУЛЕНТНОСТИ У СТРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ А

Голубков В.И., Ионтова И.М., *Войцов А.С.,
Гупалова Т.В., Тотолян А.А.

Научно-исследовательский институт экспериментальной
медицины, Ленинград;

*Ленинградский политехнический институт, Ленинград

В предварительных генетических экспериментах была показана котрансдукция фактора вирулентности стрептококка группы А /М-белка/ и детерминант резистентности к антибиотикам, последние локализованы в ранее исследованных нами плаزمидах p22095, p19035 и pERL1. Это обстоятельство позволило предположить локализацию детерминанты М-белка в указанных плазмиде. Однако локализовать фрагмент ДНК, ответственный за синтез М-белка в структуре перечисленных плазмид, было невозможно по следующим причинам: а/ трансформация плазмид и искусственно полученных их укороченных вариантов осуществляется только в стрептококки группы Н, но не в стрептококки группы А; б/ М - детерминанта не выражается в стрептококках группы Н; в/ других путей переноса генетической информации плазмид и их вариантов из группы Н в группу А пока не из-

вестно. Поиск участков ДНК плазмид, ответственных за контроль синтеза М-белка, проводится путем изучения степени гомологии между исследованными плазмидами и плазмидами вирулентных штаммов, последних из 16 произвольно выбранных вирулентных штаммов стрептококков группы А различных М-серотипов было выделено 5 : р63, р28, р49, р2, р1115 . Эти плазмиды не имели удобных для селекции маркеров, ими для стрептококков могут быть только резистентность к антибиотикам, солям тяжелых металлов, к желчным кислотам. Однако спонтанная потеря плазмид р63 и р1115 сопровождалась утратой М-белка соответствующими штаммами /эффект спонтанной элиминации остальных трех плазмид пока не исследован/. Этот факт позволяет предположить контроль синтеза М-белка плазмидами р63 и р1115 . Наиболее детально нами исследована степень гомологии между плазмидами р63 и р22095, рERL1 . Плазида Р19035 как это было показано нами ранее является аналогом плазмиды р22095 . Плазида р63 является мультикопийной /100 копий на хромосому/ миниплазмидой с молекулярным весом $1,91 \times 10^6$ а . В рестриктах ДНК Hind III плазмид рERL1 и р22095 был обнаружен общий фрагмент с молекулярным весом $1,91 \times 10^6$ а точно соответствующий молекулярному весу плазмиды р63. Интересно отметить, что плазмиды р22095 и рERL1 диссоциируют в трансформантах стрептококков группы Н с образованием криптической плазмиды молекулярного веса равного таковому плазмиды р63. Фрагменты плазмид р22095 и рERL1 молекулярного веса $1,91 \times 10^6$ а , по-видимому, содержат не только origin , но и детерминанту М-белка, при этом данный фрагмент находится в инвертированном повторе плазмиды р22095 , общая протяженность которого составляет 80% плазмидной ДНК.

В настоящее время проводятся исследования по гибридизации и гетеродуплексному анализу плазмид вирулентных штаммов как между собой, так и между маркированными плазмидами р22095 и рERL1 .

Обсуждается структура плазмид стрептококков группы А и детерминация факторов вирулентности.

К ВОПРОСУ О ТРАНСФОРМАЦИИ ДРОЖЕЙ

Григорьева С.П., Домарадский И.В., Шекина Е.В.,
Ясеневиц О.В., Бузург-заде Д.Л.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

На возможность трансформации у эукариотных организмов, в частности у дрожжей, имеются указания в литературе начиная с 1960 года. В описанных опытах по трансформации дрожжам придавали свойства ферментировать ряд сахаров, способность к синтезу некоторых пуриновых оснований и аминокислот и другие биохимические и серологические свойства.

Особый интерес вызывают виды дрожжей, используемые в промышленном производстве. По Лоддеру дрожжи рода *Saccharomycetes* не способны расти на средах с n-алканами. Но в последние годы в ряде отечественных лабораторий получены мутанты *S. cerevisiae*, усваивающие углеводороды нефти. На возможность получения углеводородокисляющих штаммов сахаромикетов способом трансформации дрожжей в литературе данных не обнаружено.

Нами выявлена возможность передачи углеводородокисляющим дрожжам *Saccharomycetes cerevisiae* специально разработанным способом трансформаций с помощью экзогенной ДНК, выделенной из углеводородокисляющих дрожжей *Candida guilliermondii*, способности к утилизации углеводородов нефти. Получены штаммы-трансформанты *S. cerevisiae*, способные усваивать жидкие очищенные парафины, которые охарактеризованы по интенсивности дыхания, изоцитратлиазной, каталазной и пероксидазной активности, по культуральным признакам. Было установлено, что их интенсивность дыхания в 6-7 раз выше, чем реципиентов и практически приближалась к интенсивности дыхания углеводородокисляющих донорных штаммов. Каталазная, пероксидазная и изоцитратлиазная активность трансформантов в 4; 2; 2,5 раза /соответственно/ превышала активность этих ферментов реципиента. Трансформанты приобрели как свойства, характерные для

доноров, так и совершенно новые свойства, например, способность ферментировать дульцит, меллибозу, арабинозу, рамнозу, рибозу, инулин.

Полученные нами данные для своей интерпретации требуют более глубокого изучения явления трансформации дрожжей.

В связи с этим изучается трансформирующая активность отдельных фракций дрожжевой ДНК. Фракции митохондриальной и 2-микронной ДНК дрожжей представляют интерес как потенциальные векторы в системе вектор-хозяин.

ОСОБЕННОСТИ ПАРАМЕТРОВ ОДИНОЧНОГО ЦИКЛА РАЗМНОЖЕНИЯ ГИБРИДНЫХ И МУТАНТНЫХ ФАГОВ ЛЯМБДА

Гусев В.А., Щелкунов С.Н.

Специальное конструкторско-техническое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск

Путь, по которому происходит развитие умеренного ффага после инфекции бактериальной клетки, зависит от генетической структуры генома как самого ффага, так и клетки-хозяина. Состав среды также играет роль в выборе литического или лизогенного пути развития ффага /Ратнер, 1975; Герши, 1975/. Кроме того, возможен и третий путь развития - репликация ффаговой ДНК в клетке автономно от бактериальной хромосомы без образования нативных ффаговых частиц и лизиса клетки, т.е. плазмидное состояние ффага λ . Для этого достаточна мутация в N-гене /Kleckner, Signer, 1977/.

В работе исследуется одиночный цикл размножения /ОЦР/ ффага λ и некоторых его мутантов и гибридов при инфицировании клеток *E. coli* W3350. Результаты экспериментов показали, что точечная мутация по *cl*-гену обуславливает более ранний лизис клеток, хотя сборка ффага λ *cl*⁻ происходит в клетке в то же время, что и для ффага λ *cl*⁺. Форма кривой ОЦР существенно зависит от множественности заражения клеток ффагами λ *gt*-C и λ *gt*-E⁻. При увеличении множественности заражения

клеток этими фагами наблюдается тенденция сохранения фага определенное время в плазмидном либо лизогенном состоянии, при этом не происходит заметного влияния на деление инфицированных клеток.

Проводится изучение влияния других мутаций в геноме фага и бактериальной клетки на параметры и вид кривой одиночного цикла размножения фага λ .

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНЫХ ПЛАЗМИД, НЕСУЩИХ ГЕНЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* K12

Данилевская О.Н., Басс И.А., Мехедов С.Л.
Институт молекулярной генетики, АН СССР, Москва

Получена серия плазмид, содержащих различные участки генов РНК-полимеразы. В качестве векторов использовали плазмиды рМВ9 и рВР322. Клонированию подвергали фрагменты ДНК трансдуцирующего фага λ rif^d47 , содержащего гены β^- и β^- -субъединиц РНК-полимеразы (гров,С), а также гены рибосомных белков L7/L12, L10, L1, L11 (gpIL, J, A, K), гены рибосомных и транспортных РНК. Для ДНК фага λ rif^d47 построена карта рестрикции специфической эндонуклеазой EcoR1 /рис. 1 а/ /размеры фрагментов обозначены в процентах от молекулярного веса ДНК фага λ /. Гены гров,С расщепляются EcoR1 на 4 фрагмента, причем один из них включает $\sim 60\%$ гена гров, а другой - $\sim 50\%$ гена С / в % от ДНК фага λ фрагменты обозначены как 6% и 5% соответственно/. Поскольку гены гров,С объединены в один оперон с генами рибосомных белков L7/L12, L10, то особый интерес представляет фрагмент 2,6%, в котором находится конец гена gpIL и начало гена гров. Возможно, в промежутке между этими генами находится регуляторная зона, контролирующая транскрипцию генов РНК-полимеразы.

Поэтому были сконструированы плазмиды, каждая из которых содержит один из 4-х EcoR1 - фрагментов генов гров,С /рис. 1 б /. Для изучения регуляции синтеза РНК-полимеразы,

необходимы плазмиды, содержащие как отдельные фрагменты, так и полные гены РНК-полимеразы. Для получения последних использовали продукты частичного гидролиза ДНК фага λ *rif^d* 47 рестриктазой *EcoR*1. В этом случае отбор клонов вели по двум признакам: по устойчивости к тетрациклину /маркер, находящийся в плазмиде pBR322 / и по устойчивости к рифампицину /ген *groV* , находящийся в фаге λ *rif^d* 47 , несет мутацию *rif^d*/. Такая двойная селекция позволила отобрать клоны, содержащие только гибридные плазмиды. На рис.1в представлены различные фрагменты, включенные в состав плазмид, отобранных таким

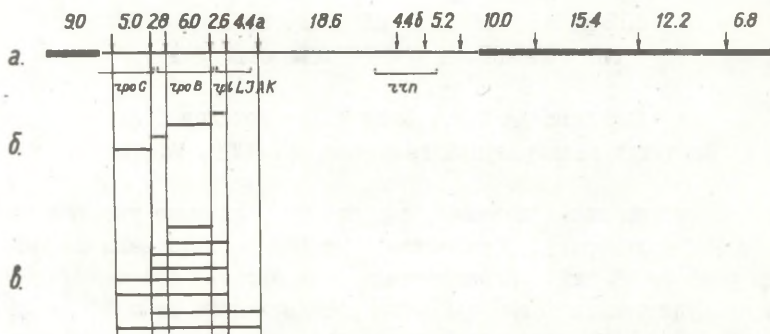


Рис.1. Рестрикционная карта ДНК фага λ *rif^d* 47. Стрелками указаны сайты действия рестриктазы *EcoR*1. Размеры фрагментов даны в %% от длины ДНК фага λ . Отдельно показаны фрагменты, включенные в состав плазмид pMB9 76/ и pBR322 /в/.

методом. Из анализа этих плазмид следует, что мутация *rif^d* находится во фрагменте 6%, поскольку он присутствует во всех плаزمидах, выделенных из клонов с *Rif^R* фенотипом.

Плазмида pDM62, содержащая фрагмент 6%, была использована для исследования транскрипции гена *groV* методом гибридизации РНК-ДНК. Ранее было показано, что небольшие дозы рифампицина, специфического ингибитора РНК-полимеразы, стимулируют в клетках скорость синтеза ее β - и β' -субъединиц. Результаты работы показали, что при действии рифампицина на

бактерии наблюдается абсолютное и относительное ускорение синтеза специфической мРНК для β -полипептида. Это указывает, что в данном случае происходит ускорение транскрипции генов РНК-полимеразы.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ ДНК ПЛАЗМИДЫ ColEI

Денисова Л.Я., Загребельный С.Н., Килева Е.В.,

Пустошилова Н.М., *Филиппов В.А.

Специальное конструкторско-техническое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск;

*Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Исследована транскрипция ДНК плазмиды ColEI в системе РНК полимеразы *E. coli in vitro*. На рис. 1 и 2 представлены кривые зависимости включения ^{14}C -NMP на этой ДНК от концентраций MgCl_2 и KCl , соответственно.

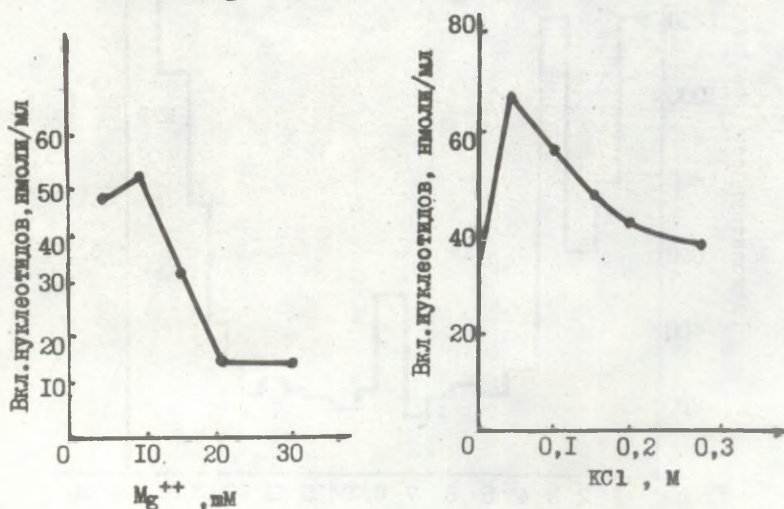


Рис. 1 и 2. Кривые зависимости включения ^{14}C -NMP на ДНК плазмиды ColEI от концентрации MgCl_2 и KCl , соответственно

Из рисунков видно, что максимальный синтез РНК на ДНК ColEI протекает в присутствии 10mM MgCl₂ и 50mM KCl.

Введение в реакционную смесь глицерина /15%, v/v / приводит к значительному увеличению скорости синтеза и выхода РНК-продукта, по-видимому, за счет облегчения глицерином расплетания промоторных областей, что, в свою очередь, облегчает инициацию синтеза РНК.

В подобранных условиях с использованием высокоочищенной РНК-полимеразы "holo" /не менее 98%-ной чистоты по данным гельэлектрофореза/ синтезирована РНК на ДНК плазмиды ColEI с выходом 50-90% от количества нуклеотидного материала матрицы.

Анализ полученных радиоактивно меченых транскриптов проводили с помощью электрофореза в 3%-ном полиакриламидном геле, содержащем 0,2% SDS. На рис. 3 представлен профиль радиоактивности, полученный после разрезания пластинки 3%-ного полиакриламидного геля на сегменты и подсчета радиоактивности в этих сегментах

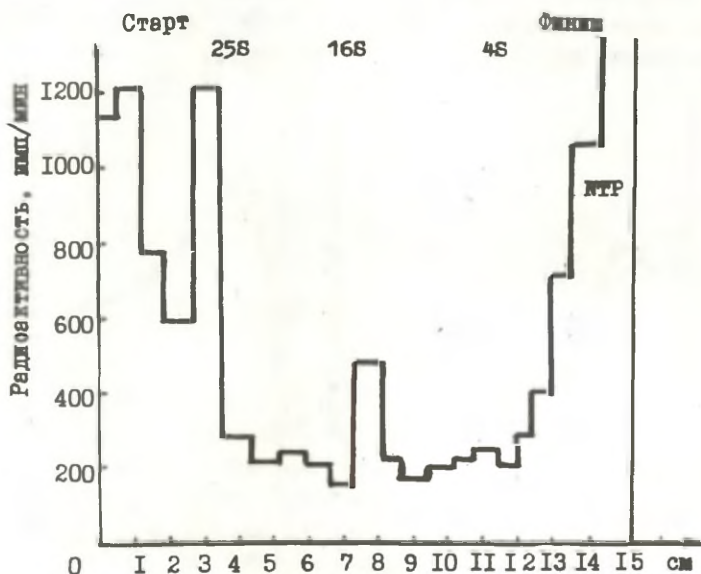


Рис. 3. Профиль радиоактивности, полученный после разрезания пластинки 3%-ного полиакриламидного геля на сегменты и подсчета радиоактивности в этих сегментах

диоактивности, полученный после разрезания пластинки геля на сегменты по 0,5 см и подсчета радиоактивности в этих сегментах.

На рисунке отчетливо видны три пика, соответствующих трем видам транскриптов: с длиной цепи 240 нуклеотидов, 1700 нуклеотидов /оценено по подвижности 4S, 16S и 25S рибосомальных РНК/ и материалу, оставшемуся на старте. Длина этого продукта была оценена электрофорезом в 2%-ной агарозе. Его подвижность совпадала с подвижностью линейной двухцепочечной молекулы ДНК ColEI.

Методом самоотжига РНК показано, что как суммарный транскрипт, так и индивидуальная РНК длиной цепи 1700 нуклеотидов не образуют материала, устойчивого к РНКазе, что указывает на асимметричный характер транскрипции ДНК ColEI.

На ДНК ColEI локализованы два места связывания с РНК-полимеразой *E. coli*. На рис. 4 представлено схематическое изображение распределения фрагментов ДНК ColEI, полученных гидролизом рестриктазой BsuRI, в 5%-ном полиакриламидном геле, и фрагментов, связывающихся с РНК-полимеразой.

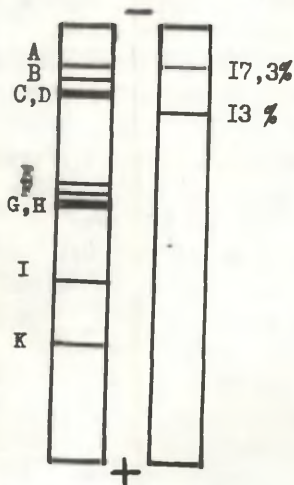


Рис. 4. Схематическое изображение распределения фрагментов ДНК ColEI, полученных гидролизом BsuRI в 5%-ном полиакриламидном геле, и фрагментов, связывающихся с РНК-полимеразой

Сравнивая две электрофоретические картины можно заметить, что РНК-полимераза связывается с фрагментом А, имеющим длину 17,3% от длины всей ДНК и являющимся частью структурного гена колицина (Ока, Таканаси, 1976). Другой фрагмент, связывавшийся с ферментом, имеет длину ~13% и, по-видимому, состоит из фрагментов F + Gu H, которые на функциональной карте плазмиды ColEI расположены возле области начала репликации ДНК ColEI (Dougan et al., 1978).

ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ПЛАЗМИД В ResA^+ И ResA^- ШТАММАХ E.coli

Ермоленко З.М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

Стабильность плазмид в клетке - важная проблема как в теоретическом, так и практическом плане.

Целью данной работы было изучение стабильности плазмид в зависимости от системы рекомбинации у клетки-хозяина.

Для изучения этого вопроса были получены две изогенные линии культур с плазмидами RPI, pKM-14, F'tetHIy, RI-19, R323 и CoIB tet. В качестве хозяев использовали штаммы E. coli AB1157 (resA^+) и E. coli AB2463 (resA^-).

При передаче вышеуказанных плазмид методом конъюгации выяснилось, что частота передачи плазмидных маркеров ResA^- штамму на 1-2 порядка ниже, чем ResA^+ штамму.

Снятие кривой роста штаммов изогенных линий в жидкой среде в стационарных условиях показало, что темпы роста контрольного бесплазмидного штамма и плазмидных штаммов как ResA^+ так и ResA^- практически не отличаются. Параллельный высев проб на чашки с соответствующими антибиотиками дал идентичную кривую роста. Только в случае ResA^+ штамма, не-сущего плазмиды RPI, CoIB tet или F'tetHIy отмечалась задержка фенотипического выражения тетрациклинового маркера.

Выращивание штаммов с плазмидой KPI в условиях аэрации выявило, что и в этих условиях темпы роста плазмидного и бесплазмидного штаммов одинаковы. Таким образом, кажется очевидным, что наличие плазмиды в клетке не влияет на темпы роста как ResA^+ так и ResA^- хозяев в стационарных условиях и в условиях аэрации.

Изучение стабильности плазмид KPI, pKM-14 и $\text{F}'\text{tetNI}_{\text{U}}$ при пересевах культур в течение 10 суток на мясо-пептонном агаре без антибиотиков показало более устойчивое сохранение всех плазмидных маркеров в клетках ResA^- хозяина. В тех же экспериментах отмечена задержка фенотипического выражения лишь тетрациклинового маркера плазмид KPI и $\text{F}'\text{tetNI}_{\text{U}}$ в клетках обеих линий штаммов.

ИССЛЕДОВАНИЕ РИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В КЛЕТКАХ E. COLI С ПЛАЗМИДОЙ V-K30

Завенягина Т.Н., Хмель И.А., Рекеш А.Н.

Институт молекулярной генетики, АН СССР, Москва

Определяли рибонуклеазную активность в осветленных лизатах клеток E. coli, несущих различные плазмиды: колициногенные факторы EI, Ib-P9, Ia-SA53, V-K30, V-K94 и F-фактор. О наличии ферментативной активности судили по образованию кислоторастворимого продукта при инкубации с экзогенной полимерной РНК. Рибонуклеазную активность контролировали также по деградации субстрата — полимерной РНК после инкубации ее с ферментным препаратом с помощью центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы 15-20%. Показано, что РНКазная активность лизатов клеток различных штаммов, содержащих плазмиду V-K30, увеличена в 2-3 раза по сравнению со штаммами без плазмиды. Присутствие в клетках E. coli других перечисленных выше плазмид не влияло на РНКазную активность в них.

Лизаты клеток E. coli C600 (EI) и C600 (EI, V-K30) хроматографировали на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой. Показано коли-

чественное и качественное различие в распределении РНКазной активности при элюции белков 0,5М NaCl . Проведена повторная хроматография этих белков на ДЕАЕ-целлюлозе в тех же условиях с очисткой фермента в 1000 раз /рис./. РНКазная активность клеток С600 (Е1) при хроматографии элюируется в области 8-11 фракций. Ферментативная активность клеток с плазмидой V-K30 распределяется двумя пиками: одним - в области 8-11 фракций, активность которого заметно выше РНКазной активности в этой же фракции в штамме без плазмиды V-K30; и вторым пиком - в области 14-16 фракций. Во всех проведенных опытах дополнительный белок 14-16 фракций, проявляющий РНКазную активность, обнаруживается только в клетках штамма с плазмидой V-K30 . Фракции белков с РНКазной активностью анализировали в SDS -электрофорезе в ПАА-геле: показано, что в штамме с плазмидой V-K30 наблюдается дополнительная фракция белка с молекулярным весом около 18000. Охарактеризована РНКазная активность 8-16 фракций белков в отношении ее потребности в моно- и дивалентных катионах, оптимального pH и термостабильности. РНКазная активность из штамма с плазмидой V-K30 отличается отношением к ионам магния и натрия и значительно более высокой термостабильностью от РНКазной активности штамма без плазмиды: РНКазная активность штамма С600 / V-K30 / не подавляется ионами магния, тогда как РНКазы штамма без плазмиды резко ингибировались в присутствии магния. Ионы натрия повышают активность РНКазы в штамме С600 / Е1 /; напротив, в штамме с плазмидой натрий снижает активность фермента. РНКазная активность штамма С600 / Е1, V-K30 /, в отличие от РНКазной активности штамма С600 / Е1 / более термостабильна как в щелочных, так и в кислых условиях. Следует отметить, что белки фракций, обладающие РНКазной активностью, не обнаруживали активности колицинов, а также не содержали фосфатазной и ДНКазной активностей.

Для выяснения структурной локализации дополнительной РНКазной активности, связанной с плазмидой V-K30 , выделяли и охарактеризовывали фермент из рибосом обоих штаммов Е. coli. Фермент был очищен в 700 раз. Разницы в активности и распределении фермента при хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе, а

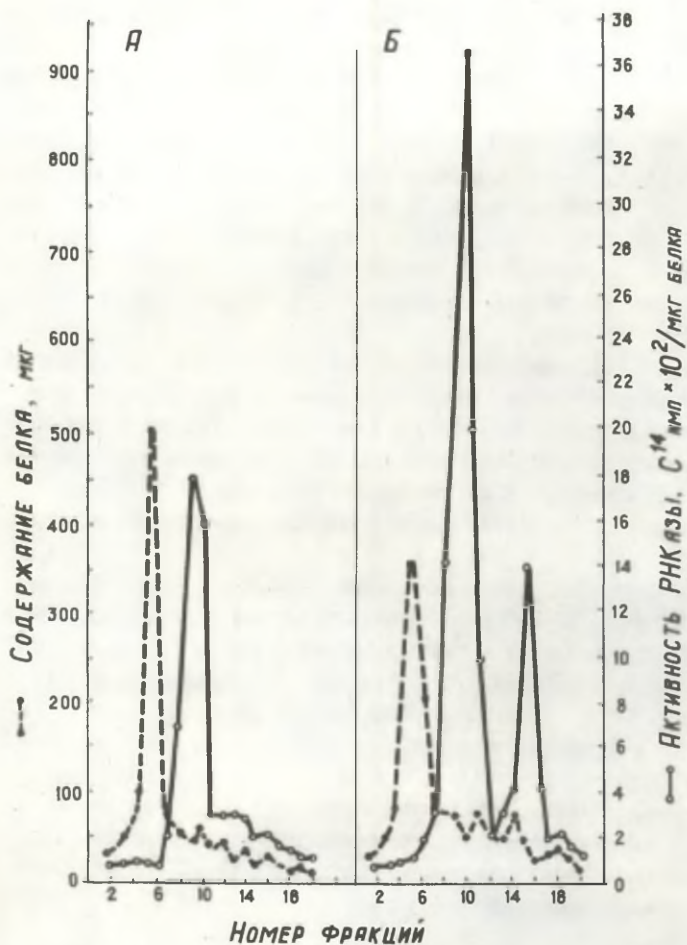


Рис. Заключительная хроматография рибонуклеаз осветленных лизатов клеток *E. coli* S600 (Е1) и S600 (Е1, V-K30) на ДЕАЕ-целлюлозе

Колонка I, 0x25,0 см; нагрузка - 10 мг белка; скорость элюции (0,5 NaCl) - 0,1 мл/мин. Элюция проводилась при 4°C.

А - хроматография РНКаз из штамма *E. coli* без плазмиды V-K30
 Б - хроматография РНКаз из штамма *E. coli* с плазмидой V-K30

также в биохимической характеристике его в штаммах с плазмидой V-K30 и без нее не наблюдалось. Следовательно, РНКазная активность, связанная с плазмидой V-K30, не локализована в рибосомах.

Выявление дополнительного пика РНКазной активности при хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе и дополнительной белковой фракции при SDS -электрофорезе в ПАА-геле в штамме с плазмидой V-K30, а также различия в биохимической характеристике РНКаз штамма с V-K30 и без нее свидетельствуют о присутствии индивидуального белка - специфической термостабильной РНКазы, возможно, кодируемой плазмидой V-K30. В настоящее время изучается влияние плазмиды на деградацию клеточной РНК *in vivo*.

Мы показали, что присутствие плазмиды V-K30 приводит к уменьшению мутагенеза, индуцированного ультрафиолетовым облучением в клетках *E. coli*, и увеличению уровня индукции синтеза колицина EI, вызванной действием различных повреждающих ДНК агентов. Возможно, влияние плазмиды V-K30 на эти процессы связано с увеличением РНКазной активности в клетках.

Нами показано, что присутствие плазмиды V-K30 приводит к уменьшению в 10-100 раз частоты реверсий ауксотрофных мутаций по аргининовому и гистидиновому локусу в клетках *E. coli* K 12 при действии УФ-облучения. Выживаемость клеток с плазмидой V-K30 при этом уменьшается. Индукция синтеза колицина EI в клетках, несущих плазмиду V-K30, при действии агентов, повреждающих ДНК /УФ - облучение, N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин/, увеличивается; этого эффекта не наблюдается в случае спонтанной индукции синтеза колицина EI и индукции, вызванной действием хлорамфеникола. Приведенные данные свидетельствуют об участии плазмиды V-K30 в клеточных процессах, связанных с репарацией поврежденной ДНК; ее влияние на эти процессы, возможно, объясняется увеличением РНКазной активности в клетках, несущих плазмиду V-K30.

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДНЫХ ПЛАЗМИД, СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ
BACILLUS SUBTILIS

Загребельный С.Н., Путинцева Н.И., Пучкова Л.И.,
Соктоев С.А., Пустошилова Н.М., *Салганик Р.И.,
*Панфилова З.И.

Специальное конструкторско-техническое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск ;

*Институт цитологии и генетики

СО АН СССР, Новосибирск

В связи с тем, что *Bac. subtilis* является продуцентом ряда биологически активных соединений, в настоящее время с помощью методов генной инженерии разрабатываются подходы для выделения индивидуальных генов и оперонов этого микроорганизма для их детального изучения.

Предпринята попытка получить гибридные ДНК на основе плазмид и нефракционированного *EcoRI* гидролизата *Bac. subtilis* ДНК.

ДНК прототрофного штамма *Bac. subtilis* и плазмиды RSF 2124 исчерпывающе рестриктировали *EcoRI* эндонуклеазой. Инактивация *EcoRI* нуклеазой исследуемых маркеров соответствует литературным данным /Harris - Warrick Elkana et al., 1975 /.

Смесь фрагментов ДНК RS F2124 и *Bac. subtilis* обрабатывали полинуклеотидлигазой и использовали для трансформации ауксотрофного по гистидину штамма *E. coli* K12 FEA 150 с нарушенной способностью к генетической рекомбинации *hsc A56* и с нарушенной системой рестрикции.

Отбор клонов, содержащих гибридную плазмиду, несущую *his*-маркер, проводили в несколько этапов.

На первом этапе на жидких питательных средах отбирали трансформанты, устойчивые к ампициллину, содержащие исходную или гибридную плазмиду. На втором этапе полученные клетки выращивали на твердых селективных средах с ампициллином в отсутствие гистидина, отбирая клоны, несущие *his*-маркер. Из нескольких объединенных клонов, не синтезирующих колицин,

была выделена плазмидная ДНК, электрофоретический анализ которой представлен на рис.1.

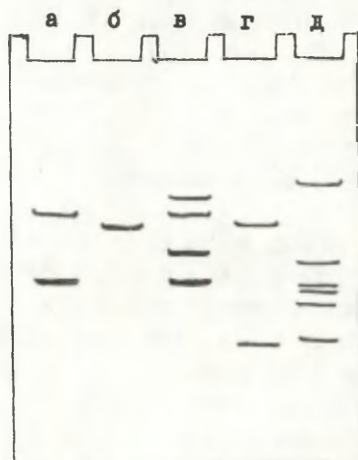


Рис.1. Электрофорез исходной /а/, гибридной /в/ плазмид и их *EcoRI* - рестриктов /б,г, соответственно/; д - *EcoRI* -рестрикты ДНК фага λ .

Данные рис. 1 свидетельствуют о том, что исследуемая ДНК состоит из двух типов молекул: гибридных, содержащих встроенный фрагмент, и исходной плазмиды.

Для получения клонов, содержащих только гибридную ДНК, был проведен еще один этап селекции, заключающийся в повторной трансформации бактерий с помощью ДНК, выделенной из клеток, отобранных на предыдущих этапах селекции, с одновременным отбором по гистидину и ампициллину, после чего была выделена и проанализирована с помощью электрофореза ДНК 4-х клонов. Электрофорез одного из клонов, содержащих гибридную плазмидную ДНК, представлен на рис.2.

Из рис. 2 видно, что встроенный фрагмент обладает молекулярным весом $\sim 2,0$ млн.дальтон. Гибридная RSF2124 ДНК

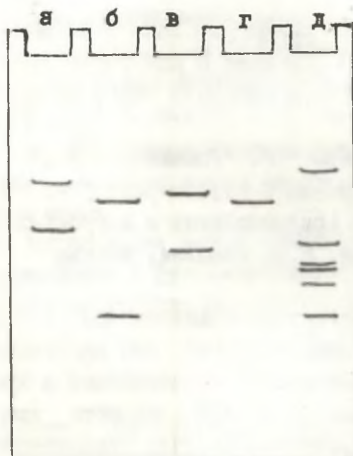


Рис.2. Электрофорез гибридной /а/, исходной /в/ плазмидной ДНК и их *EcoRI* - рестрикт /б, г. соответственно/; д - *EcoRI* - рестрикты ДНК фага λ .

превращает в результате трансформации исследованные ауксотрофные по гистидину штаммы *E. coli* в прототрофные с частотой $\sim 10^{-5}$.

Предполагается дальнейшее изучение экспрессии амплифицированных генов *Bac. subtilis* в *E. coli*.

Фрагмент гибридной ДНК RSF2124 *his*⁺, содержащий *his*-маркер, был далее перенесен в плазмиду ColeI. После трансформации *E. coli his* - смесью лигированных фрагментов ДНК RSF2125 и ColeI с последующей селекцией по аминокислоте и колицину были выделены клоны *E. coli*, содержащие индивидуальную плазмиду ColeI *his*⁺.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРАНСПОЗОНОВ С
РАЗЛИЧНЫМИ ГЕНОМАМИ И НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ О
ГЕНЕТИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ ЭТОГО ПРОЦЕССА

Ильина Т.С., Романова Ю.М.,
Нечаева Е.В., Смирнов Г.Б.

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Характер взаимодействия транспозонов с плазмидными и бактериальными геномами различен. Это проявляется в различной специфичности интеграции транспозонов в хромосому бактерии или геном плазмиды. Изучены эффекты транспозонов на свойства плазмид и взаимное влияние транспозонов различных типов.

Получены и обсуждаются данные, свидетельствующие о специфичности таких взаимодействий для транспозонов Tn9(Cm) и Tn601 (Km) .

Разработаны методы получения мутаций, влияющих на процесс транспозиции. Получены данные о генетическом контроле этого процесса и о специфичности этого контроля в случае разных транспозонов.

КЛОНИРОВАНИЕ ДНК ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА
GALLERIA MELLONELLA L. /БОЛЬШОЙ ВОШНОЙ МОЛИ/ В
СИСТЕМЕ ESCHERICHIA COLI С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПЛАЗМИДЫ pSF 2124

Ильичев А.А., Холодилов Н.Г., Киселев Н.Н., Мордвинов В.А.
Специальное конструкторско-технологическое
бюро биологически активных веществ, Новосибирск

Продукты гидролиза EcoRI ДНК вируса ядерного полиэдроза
Gal. mellonella встраивали в плазмиду pSF2124 (Ap^r, ColE1).

Анализ колицин-положительных колоний проводили методом гибридизации с вирусспецифической РНК. Дальнейшее исследование проводили методом гель-электрофореза в 0,8% агарозе.

Показана принципиальная возможность клонирования фрагментов высокомолекулярной вирусной ДНК /м.в. ДНК ВЯП Gal. mellonella - 94×10^6 / в прокариотической системе. Определены молекулярные веса встроенных фрагментов и показано их вирусное происхождение.

Обсуждаются возможности использования банка гибридных штаммов для физического и функционального картирования генома вируса ядерного полиэдроза Gal. mellonella.

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ДВУРЕПЛИКОННЫХ ГИБРИДНЫХ ПЛАЗМИД, СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ БИОСИНТЕЗА РИБОФЛАВИНА

Йомантас Ю.В., Бандрин С.В., Розинов М.Н.,
Рабинович П.М., Степанов А.И.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Сконструирован ряд двуреplikонных плазмид, содержащих вектор *Bac. subtilis* (pUB110, pCM194, pSA2100 и вектор *E. coli* (RSF2124 или pBR322). Полученные плазмиды способны к существованию как в *E. coli*, так и в *Bac. subtilis* и могут быть использованы в качестве векторов для клонирования генов *E. coli* в *Bac. subtilis*.

Показано, что детерминанты устойчивости к антибиотикам плазмид pUB110 (Km^R), pCM194 (Cm^R) и pSA2100 (Cm^R Su^R) выражаются в *E. coli*. Детерминанты устойчивости к ампициллину плазмид RSF2124 и pBR322 не выражаются в *Bac. subtilis*.

В составе двуреplikонных плазмид клонирован рибофлавиновый оперон *Bac. subtilis*. Установлено, что по крайней мере два гена *rib* оперона *Bac. subtilis* выражаются в *E. coli*. Показано, что гибридные плазмиды, содержащие *rib*-оперон *Bac. subtilis*, стабильны в клетках *E. coli*, однако нестабильны

в клетках *Bac. subtilis*.

Исключение из состава этих плазмид части рибофлавинового оперона приводит к стабилизации плазмид в бациллах.

Показано, что распад гибридных плазмид, содержащих *rib*-оперон *Bac. subtilis*, наблюдаемый при введении этих плазмид в бациллы, не зависит от *recE* функции реципиентных клеток и, по-видимому, не связан с процессом общей рекомбинации между гомологичными областями плазмиды и хромосомы реципиента.

УСТРАНЯЕМАЯ АКРИДИНОВЫМ ОРАНЖЕВЫМ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ
МУТАНТОВ *BACILLUS SUBTILIS* ИНДУЦИРОВАННЫХ
С ПОМОЩЬЮ ДНК СЕЛЬДИ

Карпова И.С.

Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев

Как показано для эукариотов работами С.М. Гершензона и др. /Гершензон, 1965; 1975; Khan, Alderson, 1965; Mathew, 1965/, чужеродная ДНК способна вызывать состояние продленного мутагенеза, при котором отмечалась нестабильность отдельных генов на протяжении ряда поколений. Исходя из гипотезы Гершензона, появление подобных мутаций объясняется прямым взаимодействием фрагмента чужеродной ДНК и хромосомы, напоминающим поведение природных эписомоподобных элементов. Идея о возможности переживания в клетке полимерного фрагмента экзогенной ДНК и его взаимодействия с хромосомой выдвигалась также Фоксом для объяснения эффекта нестабильной трансформации у дрозофилы. По его мнению, эффект нестабильности возникает на уровне транскрипции, поскольку экзогенный фрагмент ДНК пристраивается к гомологичному участку хромосомы без линейной интеграции /модель "экзосомы"/. Реальность гипотезы Фокса была продемонстрирована недавно с помощью экспериментов, позволивших выявить в клетках нестабильных "трансформантов" дрозофилы дополнительные хроматиновые структуры, при-

соединенные к хромосоме / Fox, Valencia , 1975/.

В наших опытах, задачей которых было исследование закономерностей мутагенного действия чужеродной ДНК / сельди / в системе *Bac. subtilis* /Карпова, 1975; 1976; 1979/, обратили на себя внимание *leu*⁻-ауксотрофы, выделенные после воздействия чужеродной ДНК и не найденные в контроле. Из 14 мутантов данного фенотипа семь штаммов, изолированных в пяти независимых опытах, характеризовались необычно высокой ревертабельностью и были названы нестабильными. Общая частота ревертантов таких мутантов на семь порядков превышала уровень ревертабельности исходного штамма *lys*⁻42 /ауксотроф по лейцину/ и достигла значительной величины, составляющей 30-80% от числа жизнеспособных клеток. При посеве нестабильного *leu*⁻ мутанта на селективную для него среду без лейцина ревертанты обнаруживались в самом высоком разведении, а при перепечатывании колоний с полной среды на селективную была отчетливо заметна гетерогенность реплики, имевшей вид множества не сливающихся между собой бугорков. Ревертанты отличались гетерогенностью, которая в рассевах проявлялась по срокам возникновения колоний и по их размерам. Колонии ревертантов возникали в три срока: спустя 24 ч, 48 ч и 72 ч от начала инкубации. В зависимости от величины колоний по отношению к контролю, которым служили колонии штамма *lys*⁻42 после 24 ч роста, ревертантов разбили на три класса с присвоением следующих условных обозначений: класс К - колонии типа контроля; класс М - мелкие колонии, примерно вдвое меньше контрольных; класс Мк - точечные микроколони.

В отличие от обычных ревертантов штамма-контроля, представленных однородными клетками, ревертанты описываемых нестабильных мутантов образуют собой гетерогенную в генетическом отношении популяцию, где большинство колоний содержит мутантные клетки. Мы выделили 8 фенотипически различных групп /фенотипов/ ревертантов - ревертанты к исходному типу /фенотип I/; ревертанты, ингибируемые лейцином /фенотип II/; неполные ауксотрофы /фенотип III/; простые мозаики /фенотип IV/, содержащие два типа клеток, и сложные мозаики, состоящие из нескольких типов измененных клеток, описанных выше

/фенотипы У - VIII/.

Основной отличительной особенностью мутантов, возникающих в популяции ревертантов нестабильных штаммов, явилось то обстоятельство, что из полного набора аминокислот, азотистых оснований и витаминов лишь немногие обладали способностью воздействовать на рост мутантов, описанных выше. Идентификация показала, что в рассевах ревертантов наиболее часто возникали неполные ауксотрофы по никотиновой кислоте /19,4%/, а также мутанты, ингибируемые никотиновой кислотой /29,3 %/ ; мутанты, испытывающие потребность в метионине /14,2%/ и ингибируемые метионином /1,4%/, и некоторые другие. После нескольких отборочных пассажей на селективной среде указанные типы мутантов в большинстве своем стабилизировались и могли быть выделены в виде чистых клонов.

Отличие нестабильных мутантов от исходной культуры проявилось также в неселективных условиях /изучено на примере штамма 5-3/. В этих условиях общая частота новых мутантов, обнаруживаемых методом отпечатков в рассевах нестабильного мутанта на полной среде, была примерно на порядок выше, чем в случае контроля. Она составляла 0,1 - 2,8% против 0,03 - 0,3% у штамма *Leu*42.

Определение частоты независимого возникновения вторичных мутантов различных фенотипов в потомстве 20 отдельных клонов штамма 5-3 /нестабильный/ и штамма *Leu* 42 /исходный/ выявило существенное качественное отличие данного мутанта от контроля. В случае нестабильного мутанта достоверно чаще, чем следовало ожидать, исходя из случайного характера спонтанного мутационного процесса, повторялись мутанты двух типов: стабильные лейцинзависимые ауксотрофы и ревертанты, более не обнаруживающие мозаицизма. Очевидно вторичный мутационный процесс не имеет в данном случае характера повышенной частоты мутирования многих генов, а связан с нестабильным состоянием первичной мутации, обуславливающей зависимость от лейцина.

Несмотря на высокую степень нестабильности *Leu*⁻ мутантов, они хорошо переносят хранение на столбах полноценного агара под слоем вазелинового масла /прослежено на протяжении

5 лет/. Нестабильное состояние данной группы мутантов поддерживалось также в ходе последовательных пересевов на полной среде без заметной тенденции к угасанию./Для штаммов 5-3 и 8-18 прослежено вплоть до 500 генераций/.

Как видно из описания, проявления нестабильности в потомстве *Leu⁻* ауксотрофов *Bac. subtilis*, индуцированных чужеродной ДНК сельди, наводят на мысль о неслучайном характере процессов, обуславливающих данный тип нестабильности.

В литературе описаны случаи, когда нестабильные штаммы *E. coli* /Gunderson, 1963/ и *N. crassa* /Mishra, 1976/ удавалось стабилизировать с помощью акридиновых красителей, избирательно элиминирующих экстрахромосомные элементы.

В наших опытах культуры нестабильных *Leu⁻* ауксотрофов обрабатывали А0 по методике Hirota (1960), высевали на полноценную агаризованную среду и методом отпечатков отбирали колонии стабильных ревертантов, фенотипически неотличимых от колоний исходного штамма *Leu⁺* 42.

Как видно из данных таблицы, в культурах, обработанных А0, преобладали ревертанты к исходному типу колоний, утратившие ауксотрофность по лейцину и свойство нестабильности, которое в необработанных культурах сохранялось у большинства клеток.

Таблица

Влияние А0 на реверсию нестабильных лейцинзависимых ауксотрофов к исходному стабильному типу

Штамм	Вариант опыта	Просмотрено колоний	Из них получено ревертантов		Достоверность различий
			в абсолютных числах	в %	
5-3	Контроль Опыт	1281	115	8,7 ± 1,4	0,99
		1486	1443	97,0 ± 0,9	
8-18	Контроль Опыт	1838	3	0,2 ± 0,1	0,99
		602	578	90,4 ± 2,3	
12-9	Контроль Опыт	1870	84	9,9 ± 1,0	0,99
		1296	1268	98,5 ± 0,4	

Таким образом, АО обладал способностью устранять нестабильность описанных *Leu⁻* ауксотрофов. Это позволяет рассматривать наиболее вероятной причиной лейцинзависимости и нестабильности указанных штаммов присутствие в клетке чужеродного фрагмента ДНК, способного ассоциироваться с лейциновыми локусами, которые у *Bac. subtilis* сцеплены между собой.

При обсуждении результатов проводится сопоставление полученной в данной работе экспериментальной системы нестабильности с известными примерами природной нестабильности бактерий, обусловленной активностью эписомоподобных структур.

ИНДУКЦИЯ СИНТЕЗА КАТЕХОЛ-2,3-ОКСИГЕНАЗЫ И РАННИХ мРНК У ШТАММОВ ПСЕВДОМОНАД

Кильк А.Х., Хейнару А.Л., Касак Л.А.
Тартуский государственный университет, Тарту

ТОЛ плазмиды обеспечивают синтез ферментов для деградации толуола и ксилена или их мета-производных; при этом расщепление ароматического ядра происходит по мета-положению.

Бактерии *Pseudomonas putida* имеют и хромосомные гены, определяющие расщепление этих же соединений, но по орто-положению. Метазамещенные соединения по хромосомному пути не расщепляются. При наличии в клетке *Pseudomonas putida* ТОЛ плазмиды хромосомные гены не экспрессируются, а мета-расщепление ароматических соединений идет по плазмидному пути.

Молекулярный вес ТОЛ плазмиды штамма *Ps.putida* (arvilla) mt-2 равен 78 Md. Для составления генетической карты ТОЛ плазмиды и клонирования плазмидо-специфических генов необходимо иметь раннюю мРНК для ТОЛ-специфических ферментов. Одним из первых ферментов плазмидного пути является катехол-2, 3-оксигеназа /K230/. Задачей настоящей работы явилось изучение кинетики индукции синтеза K230 и ранних мРНК у ТОЛ⁺ штаммов *Ps. putida*.

Микробы культивировали в среде, где единственным источ-

ником углерода и энергии /а также индуктором ТОГ-специфических генов/ служил м-толуат. Следовательно, весь метаболизм клетки был направлен через экспрессию плазмидных генов.

В предварительных опытах нами была разработана новая методика определения индукции синтеза K230 на уровне интактных клеток. С этой целью были оптимизированы состав питательной среды, количество добавляемых микроэлементов, концентрация клеток в реакционной смеси и условия культивирования микробов при аэрации культуры.

Применяя питательные среды, содержащие низкие концентрации фосфата, удалось получить полную индукцию синтеза K230 до размножения основной части микробов в изучаемой популяции /рис. I /. В типичных случаях интенсивная индукция синтеза

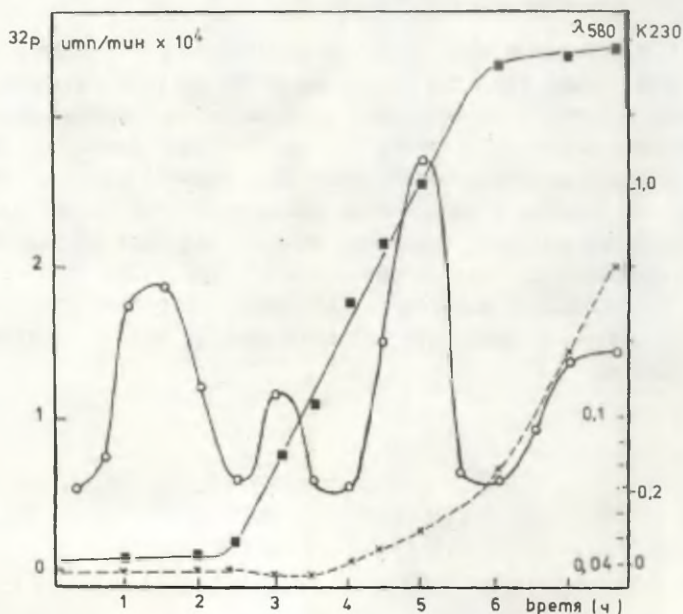


Рис. I. Включение ^{32}P -ортофосфата в клетки *Ps. putida* во время индукции синтеза катехол-2,3-оксигеназы.

о-о - включение ^{32}P

■-■ - активность катехол-2,3-оксигеназы

х-х - рост микробов

Об активности K230 судим по возрастанию количества 2-гидрокси-муконсемиальдегида /мкмоль/мин. /о.е. клеток при $\lambda = 580$ /.

K230 начиналась спустя 2,5 часа после перенесения клеток в среду с м-толуатом и продолжалась около трех часов. В опыт брались клетки в логарифмической фазе роста, растущие на сукцинате. Время лаг-периода до интенсивной индукции K230 зависело от физиологической активности подопытных клеток, а также от промывания и условия центрифугирования клеток. Во всех опытах выявилась тенденция снижения оптической плотности микробной популяции перед интенсивной индукцией синтеза изучаемого фермента, что, вероятно, не связано со снижением в популяции количества жизнеспособных клеток. В опытах с использованием *TOI* плазмиды *TOI*⁺ (Chakrabarty et al., 1978) во всех случаях мы получили несколько более низкий уровень индукции K230 по сравнению с первоначальной *TOI* плазмидой /рис. 2 /.

При тотальном мечении нуклеиновых кислот ³²P ортофосфатом выявлялись три пика включения метки /рис. 1 /. Начало индукции синтеза K230 совпадало по времени со средним кратковременным пиком. Обусловлены ли этот пик синтезом мРНК ?

Дальнейшие опыты по изучению включения ³H-урацила в нуклеиновые кислоты и параллельно деградации мРНК при помощи рифампицина выявили, что время начала индукции синтеза K230 действительно связано с синтезом мРНК /рис. 2 /.

Разработанный нами подход изучения экспрессии плазмидных генов можно рекомендовать для исследования всех плазмид биодеградации.

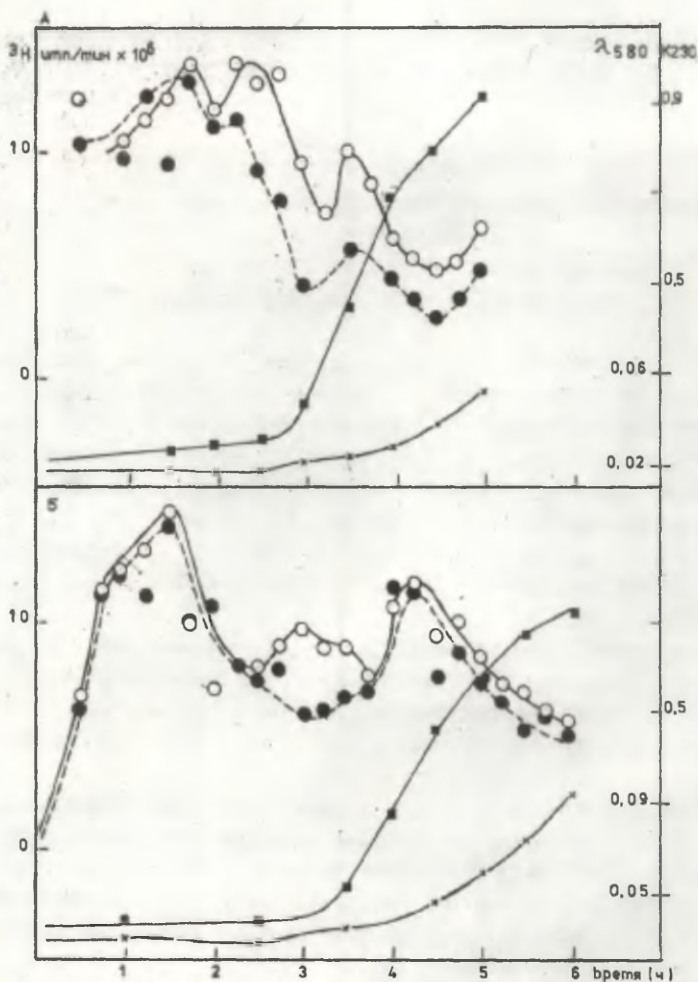


Рис. 2. Включение ^3H -урацила в клетки *Ps. putida* во время индукции синтеза K230. А - *Ps. putida(arvilla) mt-2 TOL⁺*; Б - *Ps. putida AC804 met- TOL⁻*.
 -o-o- - включение ^3H -урацила в РНК; -●-●- - включение ^3H -урацила в РНК в присутствии рифампицина; -■-■- - активность K230; x-x - рост микробов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ Т-ФАГОВ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ R-ПЛАЗМИД НЕКОТОРЫХ ГРУПП НЕСОВМЕСТИМОСТИ

Кисличкин Н.Н., Коротяев А.И.,

* Домарадский И.В.

Кубанский медицинский институт им. Красной Армии,
Краснодар;

* Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

Наиболее простым, быстрым и удобным методом определения отношения вновь выявленных R-плазмид к известным группам несовместимости является использование донорспецифических бактериофагов. Однако из 25 известных групп несовместимости с помощью таких фагов удается определить лишь плазмиды к следующим двенадцати Inc -группам: Inc FI - Inc FV, Inc 12, Inc I , Inc I , Inc P, Inc T, Inc W, Inc N. Донорспецифических фагов для идентификации R-плазмид, относящихся к другим группам, пока не предложено.

Возможность использования фагов для определения принадлежности R-плазмид к Inc-группам может зависеть не только от свойств самих фагов, но и от свойств клеток-хозяина, используемого в качестве универсального реципиента для R-факторов.

В связи с этим в настоящей работе была предпринята попытка изучить возможность использования для ускоренной идентификации R-плазмид некоторых Т-фагов. Основной предпосылкой для этих исследований явилось выделение штамма кишечной палочки, оказавшегося природно устойчивым к некоторым Т-фагам и эффективным реципиентом.

Передачу данному штамму конъюгативных прототипных и вновь выявляемых R-плазмид осуществляли, создавая конъюгационную систему по методу Watanabe и Fukasawa /1961/.

Для изучения совместимости R-факторов использовали метод Coetzee et al., /1972/.

Чувствительность культуры, несущей R-плазмиды, к фа-

гам изучали спот-тестом и по методу Грациа. (Gratia, 1936) .

Были изучены донорспецифические свойства некоторых Т-фагов, а также фага P1 к стандартным плазмидам следующих Inc - групп: Inc PII, Inc O, Inc N, Inc W, Inc X, Inc A, Inc I₄, Inc I₁, Inc H, Inc K, Inc T, Inc J, Inc M, Inc L, Inc C, Inc S, Inc P, а также к большой группе rKMR- плазмид, выделенных из диких штаммов шигелл и кишечной палочки.

Проведенными исследованиями установлено, что ни одна из изученных прототипных и вновь выявленных rKMR - плазмид не наделяет чувствительностью изолированный штамм E. coli к фагу P1. В то же время один из Т-фагов /тз / оказался донорспецифическим в отношении плазмид, принадлежащих к трем группам несовместимости: Inc X, Inc A, Inc J, а другой - к двум.

Таким образом, с помощью изученных фагов можно быстро идентифицировать R-плазмиды некоторых групп несовместимости. Эти фаги проявляли донорспецифические свойства также к восьми вновь выявленным у диких штаммов шигелл и кишечной палочки вариантам rKMR- плазмид.

Исследования возможности использования других коли-фагов для ускоренной идентификации R-плазмид продолжаются.

ТРАНСДУЦИРУЮЩИЕ ФАГИ С ГЕНАМИ groV И groC РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ИЗ ФАГА λ att80

Ковалев Ю.Н., Федосеева В.Б., *Данилевская О.Н.,
*Александров А.А., *Миндлин С.З.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
прикладной микробиологии, пос. Протвино, Моск. обл.;

*Институт молекулярной генетики, АН СССР, Москва

Ранее в лаборатории молекулярных основ генетики ИМГ АН СССР был получен трансдуцирующий фаг λ drif^d47, включивший область хромосомы bfe- groV E. coli, но содержащий только часть гена groC. Для получения трансдуцирующего фага с обоими генами β -субъединиц РНК-полимеразы мы взяли гибридный

фаг λ att 80с1857с7 . Этот гибридный фаг выделен В.Н. Рыбчиным и А.Н. Сварчевским; он унаследовал область att-1st-xis от фага ϕ 80 и поэтому характеризуется специфичностью его интеграции.

Мы построили карту рестрикции ДНК фага λ att80 для эндонуклеазы EcoRI /рис. 1 /.



◆ - САЙТ РЕСТРИКЦИИ EcoRI

Рис. 1. Генетическая и рестрикционная карты λ att80. Величина фрагментов ДНК на рис. 1, 2 и 4 дана в тысячах нуклеотидных пар /кнп/.

ДНК гибридного фага расщепляется этой рестриктазой на 4 фрагмента, из которых 3 совпадают по своей электрофоретической подвижности с фрагментами фага λ , а четвертый содержит ДНК ϕ 80. На гетеродуплексе ДНК фагов λ и λ att80 также виден только один большой негомологичный участок в центральной части ДНК этих фагов /рис. 2 /.

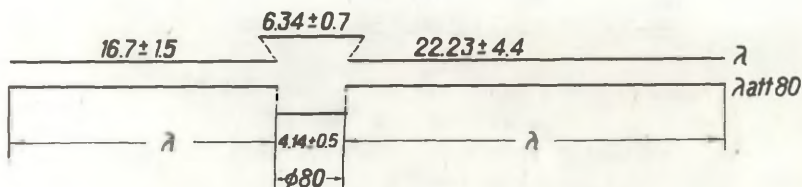


Рис. 2. Схема гетеродуплекса ДНК λ и λ att80

Разница между делетированной частью ДНК λ и вставкой ДНК ϕ 80 составляет 1,9 кнп по результатам электрофореза. Это согласуется с данными гетеродуплексного анализа ДНК фагов λ и λ att80 , по которым ДНК λ на 2,2 кнп больше

ДНК λ att80 /рис. 2 /. Величина ДНК λ att80 составляет $\sim 45,0$ кнп, что соответствует величине плавучей плотности частиц этого фага $\sim 1,4957$ г/мл /плавучая плотность ДНК $\lambda = 1,5000$ г/мл/.

Мы предлагаем использовать гибридный фаг λ att80 в качестве вектора при создании трансдуцирующих фагов. Он имеет всего 3 сайта рестрикции для EcoRI по сравнению с 5 и 9 сайтами для родительских фагов λ и ϕ 80 и значительно лучше отделяется от трансдуцирующих фаговых частиц при центрифугировании.

Как показали Т.С. Ильина с соавторами, для интеграции фага λ att80 в необычные сайты хромосомы *E. coli* необходимо предварительно удалить из нее два участка предпочтительной посадки фага λ att 80. После этого он может интегрировать в другие места на хромосоме *E. coli*. Лизогенный штамм с профагом λ att80 в локусе *bfe*, любезно предоставленный Ильиной Т.С., был использован нами для получения трансдуцирующих фагов. С помощью PI трансдукции в хромосому этого штамма мы ввели доминантную мутацию устойчивости к рифампицину, *rif^d21*. Из полученного штамма индуцировали методом тепловой индукции профаги и получили LFT-лизаты с титром $1-3 \times 10^7$ б.о.ч. Частота возникновения *Rif-r* трансдуктантов составляла 10^{-3} и 10^{-5} в штаммах *RecA⁺* и *Rec A⁻* соответственно. Как и в случае с фагами λ *rif^d*, среди нескольких десятков изученных трансдуктантов штамма *RecA⁺* не было найдено нестабильных гетерогенот типа *rif-s/rif-r*, тогда как около 1/2 трансдуктантов штамма *Rec A⁻* являлись таковыми и продуцировали НГТ-лизаты, содержащие в высоком титре частицы λ att80*rif^d*. В общей сложности было изучено 30 таких трансдуктантов; все они образовывали фаги типа λ dgal.

Поскольку трансдуктанты имели фенотип *Rif-r*, мы заключили, что соответствующие профаги содержат в геноме функционирующий ген *groV* для β -субъединицы РНК-полимеразы. Для выявления трансдуцирующих фагов с функционирующим геном *groC*, β -субъединицы РНК-полимеразы осуществляли трансдукцию фагами λ att 80 *rif^d* штаммов *E. coli*, несущих термочувствительную мутацию *ts X* в гене *groC*. Появление *ts⁻* колоний с

нормальной активностью РНК-полимеразы служило критерием наличия функционирующего гена *proC* при отборе трансдуцирующих фагов. Было отобрано три таких фага $\lambda_{att80 rif^d}$. Препаратами этих фагов заражали УФ-облученные бактерии и определяли синтез β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы. Во всех случаях наблюдали четкую картину стимуляции синтеза обоих полипептидов. Соответствующие данные для фага $\lambda_{att80 rif^d35}$ приведены на рис. 3. Для сравнения здесь же приведены данные для ранее полученного фага λ_{rif^d47} , несущего только полный ген β -субъединицы.

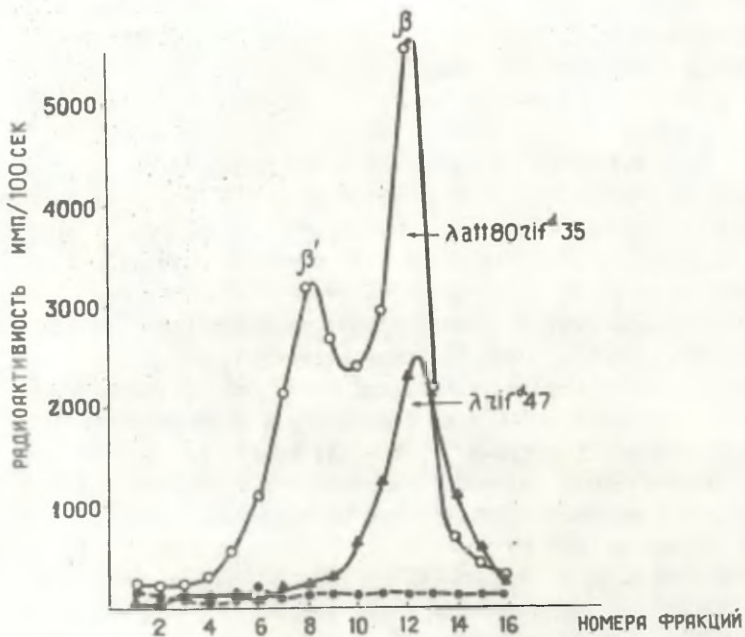


Рис. 3. Индукция синтеза β - и β' -субъединиц РНК полимеразы фагами λ_{rif^d47} и $\lambda_{att80rif^d35}$ в УФ-облученных клетках. Клетки К19, облученные УФ (—●—), зараженные λ_{rif^d47} (—▲—) и $\lambda_{att80 rif^d35}$ (—○—).

На рис. 4 представлены карты рестрикции эндонуклеазой *EcoRI* ДНК фагов λ rif^d47 и λ att80 rif^d35. Из 11 фрагментов ДНК фага λ att80 rif^d35 9 совпадают с фрагментами ДНК фага λ rif^d47. Концевой фрагмент у λ att80 rif^d35 больше по

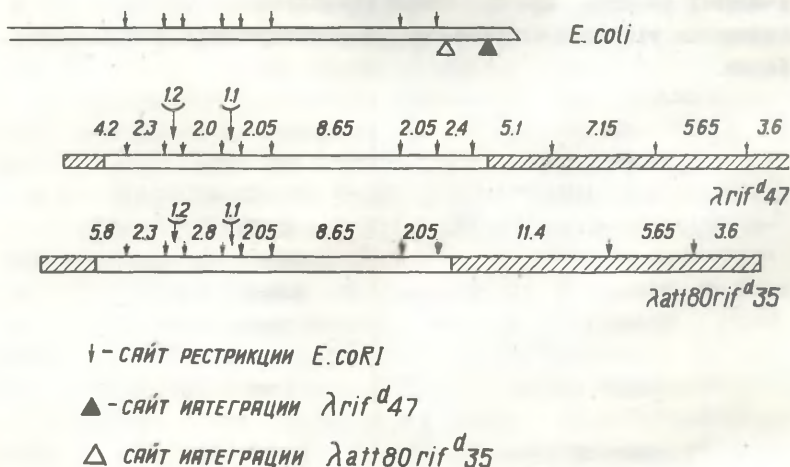


Рис. 4. Рестрикционные карты для эндонуклеазы *EcoRI* ДНК трансдуцирующих фагов λ rif^d47 и λ att80rif^d35. Вверху показана карта участка хромосомы *E. coli*, включенного в геном трансдуцирующих фагов. Участки карт, соответствующие фаговому геному, заштрихованы.

величине. В этом фрагменте у фага λ rif^d47 содержится неполный ген *groC*. В центральной части генома λ att80 rif^d35 отсутствует сайт рестрикции и соответственно дополнительный фрагмент, имеющийся у λ rif^d47. Мы предполагаем, что при образовании трансдуцирующего фага λ rif^d47 интеграция фага λ в локусе *bfe* произошла в ином сайте, нежели интеграция фага λ att80, при создании фага λ att80 rif^d35. Последний включился ближе к генам РНК-полимеразы, что способствовало отбору трансдуцирующих фагов, несущих весь оперон *groBC*.

Трансдуцирующие фаги с генами РНК-полимеразы использовались для исследований по молекулярной генетике:

1. Для клонирования фрагментов генов *groV* и *groS* на плазидах; 2. Для изучения регуляции синтеза РНК-полимеразы в опытах *in vivo* при заражении УФ-облученных клеток. 3. В опытах *in vitro* в системе сопряженной транскрипции и трансляции.

НОВЫЙ ВАРИАНТ ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ПРИРОДЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПЛАЗМИД

Коротяев А.И., Кисличкин Н.Н., Манувахова М.Ш.,
Панов А.Г., Максимов В.Ф., Малышева Т.В.,
*Домарадский И.В.

Кубанский медицинский институт им. Красной
Армии, Краснодар;

*Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

В качестве универсального реципиента для конъюгационных систем с целью передачи плазмид обычно используют *Escherichia coli* K12 F⁻ и ее производные.

Такие штаммы, несущие R-плазмиды, вместе с тем проявляют избирательную чувствительность к различным фагам, которая определяется наличием специфических рецепторов на донорных пиллах или на клеточной поверхности бактерий.

В связи с тем, что для кишечной палочки изолировано уже около 90 различных колифагов, можно предположить, что различные варианты кишечной палочки, существующие в природе, могут значительно отличаться по своему отношению к колифагам. Поэтому существует возможность выделения из природы штаммов кишечной палочки, которые могут быть такими же эффективными реципиентами, как и *E. coli* K12 F⁻, но обладать иным спектром чувствительности после инфицирования их R-плазмидами к колифагам.

Нами изолирован и изучен новый вариант *E. coli*, обладающий некоторыми генетическими особенностями.

Для изучения свойств этого штамма использованы обычные бактериологические методы, универсальные /МПА, МПБ/ и дифференциально-диагностические /Эндо, Гисса и другие/ питательные среды. Чувствительность к фагам изучали с помощью спот-теста и по методу Грациа /Gratia, 1936/.

Принадлежность выделенной культуры к виду *Escherichia coli* определена на основании следующих признаков /Берджи, 1974/: клетки имеют вид прямых палочек величиной 1,5-1,3 x 0,3-0,5 мкм, подвижны, перитрихи, спор и капсул не образуют, по Граму не окрашиваются. Штамм является прототрофом, оксидазоотрицательным, глюкозу расщепляет с образованием кислоты и газа, ферментирует арабинозу, лактозу, мальтозу, маннозу, сорбит, ксилозу, восстанавливает нитраты в нитриты, образует индол, обладает лецитин- и орнитиндекарбоксилазой, дает положительную реакцию с метиловым красным, не ферментирует сахарозу, дульцит, инозит, не образует ацетилметилкарбинола, не усваивает цитрата натрия, не образует сероводорода, не обладает уреазной активностью.

Выделенный штамм оказался хорошим реципиентом (F^-) при конъюгационной передаче ему R-плазмид от различных доноров. Из него получены два мутанта, один из которых устойчив к налидиксовой кислоте, а другой - к рифампицину. Мутанты использовали для передачи им стандартных плазмид I7 групп несовместимости. Основной генетической особенностью выделенного штамма является его устойчивость к некоторым колифагам. Вместе с тем, при передаче этому штамму как стандартных R-плазмид некоторых Inc-групп, так и выделенных от диких штаммов шигелл и кишечной палочки *pKMR*-плазмид, он становится чувствительным к тому или иному фагу.

Таким образом, свойства данного варианта *E. coli* позволяют с успехом использовать его как в качестве универсального реципиента R-плазмид, так и для ускоренного определения их принадлежности к известным группам несовместимости с помощью соответствующих фагов.

ПЛАЗМИДЫ УРОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*

Корягина И.П., Бондаренко В.М.

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

На ряде экспериментальных биологических моделей нами было установлено, что культуры *E. coli*, выделенные из мочи детей, больных пиелонефритом, характеризуются двумя наиболее часто встречающимися признаками патогенности: маннозореагентной адгезивной активностью в отношении клеток эпителия почек человека (РН) и способностью увеличивать проницаемость капилляров. Такие штаммы обуславливали у мышей линии СВА, зараженных по методу Монтомгери и др. /1972/, гистологически подтвержденного пиелонефрита /Бондаренко и др., 1979/.

Изучение биологических характеристик 28 уропатогенных штаммов *E. coli* показало, что 5 из них обладали быстропроявляющейся способностью увеличивать проницаемость сосудов, 3 штамма образовывали уреазу, 5 - продуцировали термолабильный энтеротоксин, тестируемый на клетках линии СНО /клетки яичников китайского хомячка/, 5 - гемолизин, 7 - колицины группы V, 3 штамма синтезировали биологически активный продукт, токсичный для клеток почек африканских зеленых мартышек /линия Vero /. Большинство вышеуказанных фенотипических признаков бактерий контролируется, как известно, плазмидами.

Целью настоящей работы является попытка установить корреляцию между уропатогенностью штаммов *E. coli* и наличием у культур плазмид, продукты которых способны повреждать эпителий и сосуды. Прежде всего была изучена способность 28 штаммов *E. coli* вызывающих у мышей развитие пиелонефрита, формировать трансконъюганты в системе тройного скрещивания, указывающая на наличие у тестируемых бактерий фактора передачи. Фактор передачи был обнаружен нами у 19 из 28 уропатогенных культур *E. coli*.

Определение у сформированных трансконъюгантов *E. coli* K12 200PS (RSF2124) фенотипических признаков, коррелирующих с

наличием у бактерий плазмид, показало, что в 5 случаях фактор передачи был сцеплен с *colV*, в 3-х с *hly*, в 4-х с *ent* маркерами и в 7 случаях с криптическими плазмидами, продукты которых были токсичны для клеток линии *Vero*.

Интерес представляло изучение способности трансконъюгантов *E. coli* K12 200 PS, приобретших плазмиды *Hly*, *ColV* и *Ent* типа, увеличивать проницаемость сосудов, коррелирующей в ряде случаев с развитием экспериментального пиелонефрита у мышей линии СБА. Указанную способность бактерий тестировали в опытах интраназального заражения мышей этой же линии. Об увеличении проницаемости капилляров судили на основании пропитывания синим Эванса легочной ткани животных по методу, описанному нами ранее /Ж. микробиол., 1979, № 5/. Контролем в опытах служили бактерии ко-изогенного реципиентного штамма *E. coli* K12 200 PS.

Проведенные исследования показали, что *Hly*, *ColV* и *Ent* трансконъюганты и их фильтраты в отличие от исходной реципиентной культуры характеризовались способностью увеличивать проницаемость сосудов легких, регистрируемой через 18 ч. от момента введения. Результаты выборочного морфологического исследования легких мышей подтвердили указанные различия в поведении изучаемых штаммов. Бактерии исходного реципиентного штамма *E. coli* K12 200 PS через 18 ч. после интраназального заражения мышей вызывали развитие слабо выраженной лейкоцитарной реакции в легких и не оказывали повреждающего действия на сосуды. Бактерии *Hly*, *ColV* и *Ent* трансконъюгантов обуславливали более выраженную лейкоцитарную реакцию в легких, сопровождающуюся накоплением в альвеолах небольшого количества серозной жидкости.

Морфологические исследования показали, что увеличение проницаемости сосудов развивается на фоне воспалительной лейкоцитарной реакции в легких. Результаты, полученные нами при использовании в опытах ко-изогенных пар штаммов, позволяют предположить, что сосудистые нарушения обусловлены, по-видимому, все же продуктами генов *hly*, *colV* и *ent*. Визуально сходная сосудистая реакция, регистрируемая по степени пропитывания легочной ткани красителем, отмечена нами также в случае интраназального инфицирования мышей трансконъюган-

тами, приобретенными криптические плазмиды, обнаруженные у части уropатогенных штаммов *E. coli*.

Как видно из представленных данных, уropатогенные штаммы *E. coli* несут по крайней мере одну из плазмид, продукты которых способны вызвать воспалительную реакцию, сопровождающуюся повреждением сосудов.

НОВАЯ ПЛАЗМИДА БИОДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА

Кочетков В.В., Еремин А.А., Перебиток А.Н.,
Старовойтов И.И., Воронин А.М.
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
АН СССР, г. Пушкино

К настоящему времени известны четыре плазмиды, контролирующие катаболизм нафталина бактериями рода *Pseudomonas*. Плазмида *NaN* была открыта Данин и Гонзалесом. Плазмиды *pBS2*, *pBS3*, а также *NPL-1* и ее мутант *NPL-41* были обнаружены в нашей лаборатории. Показано, что плазмиды биodeградации нафталина отличаются друг от друга по ряду свойств, включая различия в их генетических системах. В частности плазмиды *NaN* и *pBS3* содержат генетические детерминанты, контролирующие окисление нафталина через салициловую кислоту и катехол с использованием "мета" расщепления ароматического кольца катехола. Плазмида *NPL-1* и ее мутант *NPL-41* контролируют первичные этапы окисления нафталина до салициловой кислоты, причем в отличие от *NPL-1* детерминирующей индуцибельный синтез ферментов катаболизма нафталина, *NPL-41* осуществляет контроль конститутивного синтеза этих ферментов. Плазмида *pBS2* контролирует окисление нафталина и его интермедиатов салициловой кислоты и катехола с использованием "орто" расщепления ароматического кольца катехола.

В настоящем сообщении описывается обнаружение в нафталинооксиляющем (Nah^+) штамме *Pseudomonas putida* BS291 новой плазмиды, названной *pBS4*. Ранее нами было показано, что штамм *Pseudomonas putida* BS291 в отличие от других штам-

мов нафталинокисляющих бактерий осуществляет схиление нафталина через гентизиновую кислоту в качестве промежуточного продукта. При трансформации плазмидной ДНК /I20 Md/, выделенной из этого штамма в штамм *Pseudomonas putida* PpG1 (CAM) *met*⁻ были получены *Nah*⁺ колонии. Молекулярный вес плазмидной ДНК, выделенной из трансформанта /I20 Md/, а также рестрикционный анализ плазмидных ДНК исходного штамма и трансформанта свидетельствовали об их идентичности.

Плазмида pBS4 не способна к конъюгационному переносу в различные реципиентные штаммы как из исходного штамма BS291 так и из трансформанта PpG1 (CAM; pBS4) *met*⁻. При использовании в качестве донора трансформанта PpG1 (CAM; pBS4) *met*⁻ наблюдался перенос только плазмиды CAM с частотой $\sim 10^{-3}$. Попытки мобилизации плазмиды pBS4 с помощью K-фактора также не привели к положительным результатам. Результаты конъюгационного переноса тестерных плазмид групп несовместимости P-2, P-7, P-9 в трансформант, несущий плазмиду pBS4, а также в исходный штамм PpG1(CAM) *met*⁻, показывают, что наличие в этом штамме плазмиды pBS4 приводит к снижению частоты конъюгационного переноса тест-плазмиды Rms148, относящейся к группе несовместимости P-7. Обнаружение новой плазмиды биодеградация нафталина в дополнение к известным создает возможность для сравнительного изучения генетических систем этих плазмид и их филогенеза.

ДАННЫЕ О НОВЫХ R ПЛАЗМИДАХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Курносова Л.М., Суворова Т.И., Домарадский И.В.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

Описаны свойства конъюгативных R плазмид, обнаруженных у 13 произвольно взятых штаммов *Ps. aeruginosa*, выделенных в клиниках и обладающих выраженной лекарственной резистентностью /таблица/.

Эти штаммы отличались друг от друга по частоте передачи плазмид R штамму ML4262 (*rif*^{-r}, *his*⁻*trp*⁻*met*⁻*ilv*⁻), взя-

Таблица

Штаммы *Ps. aeruginosa* - доноры R плазмид .

Плазмиды	Антибиотики, к которым передается резистентность при внутривидовой конъюгации
RI7к	CbCmKmSmS и TcHg
RI4к	CmKmSmHg
R 7к	CbKmSmHg
R34к	CmKmSmHg
R30к	CmSmHg
RI5Iк	CmKmSm
R49к	CmSmHg
RIx	GmSmHg
R5Ix	CmSmHg
R4x	CmHg
R6x	GmSmHg
RI57к	CmSm
R3к	KmSm

тому в качестве реципиента $/10^{-3} - 10^{-5}$ трансконъюгантов на клетку донора/. Донорная способность полученных трансконъюгантов подтверждена повторными переносами R плазмид при конъюгации на штамм *ML4600 (his⁻, trp⁻)*, которая шла с большей частотой, чем первоначальная $/10^{-2} - 10^{-3}/$. Проверка части полученных трансконъюгантов показала стабильное сохранение популяциями клеток маркеров резистентности после 10-кратных пересевов в средах без антибиотиков.

Обнаруженные плазмиды пока не удалось передать разным штаммам кишечной палочки. Однако от пяти штаммов синегнойной палочки из числа обладающих устойчивостью к ионам ртути /RI7к, R7к, R49к, R5Ix, R4x/, удалась передача штамму 329 кишечной палочки маркера резистентности к солям ртути. Физико-химические исследования, выполненные А.В. Осадчей, позволили объяснить это явление транслокацией ртутного транспозона. Указанный транспозон у большинства трансконъюгантов кишечной палочки стабильно сохранялся при пересевах культур на средах без ионов ртути и мог быть перенесен на другие штаммы

кишечной и синегнойной палочек.

Как исходные штаммы синегнойной палочки, так и полученные трансконъюганты, содержащие изучаемые R плазмиды, оказались нечувствительными к бактериофагам PR4 и PRR1, что указывает на их принадлежность к иным группам несовместимости, чем Inc P-I. Пять из шести изученных плазмид, кроме того, хорошо совмещались в клетках штаммов ML4262 и ML 4600 с Inc P-I плазмидой R638. Интересно, что совмещение двух из них /R51x и R4x/ с плазмидой R638 приводило к ограничению размножения фагов PR4 и PRR1 в клетках полученных трансконъюгантов.

Проведены опыты по совмещению плазмид /R7k и RI7k/ со стандартными R плазмидами восьми групп несовместимости: RP4 (Inc P-1), Rms178 (Inc P-2), R1b151 (Inc P-3), R1b5265 (Inc P-4), Rms163 (Inc P-5), RP-2 (Inc P-6), Rms148 (Inc P-7), Rms149 (Inc P-8).

Определение группы несовместимости плазмиды RI7k показало важность выполнения всего комплекса трудоемких исследований, при которых делались попытки совмещения указанной плазмиды с каждой из стандартных, используя ее как в штамме-доноре, так и в реципиенте. Анализ результатов этих опытов и сопоставление их с данными одномоментной постановки опыта по совмещению плазмиды RI7k со всеми стандартными позволили отнести ее к самой распространенной из групп несовместимости R плазмид синегнойной палочки Inc P-2. Плазида R7k предварительно отнесена нами к группе несовместимости Inc P-3.

ВЫДЕЛЕНИЕ 25 мк КОЛЬЦЕВОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ИЗ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Ларионов В.Л., Аверьянов А.В., Гаузе Г.Г.
Ленинградский государственный университет, Ленинград

Целый ряд биохимических и генетических данных указывает на то, что митохондриальная ДНК /мтДНК/ дрожжей-сахаромицетов является кольцевой молекулой с контурной длиной 25 мк.

Вместе с тем, выделить такие молекулы из дрожжей до сих пор никому не удалось, препараты изолированной мтДНК дрожжей обычно представляют собой гетерогенную по длине популяцию линейных молекул. Эти данные были использованы группой Слонимского при создании концепции "фрагментированного" митохондриального генома у дрожжей.

В настоящей работе сообщается об успешном выделении интактной мтДНК из петергофской линии дрожжей *S. cerevisiae*.

При выделении мтДНК из дрожжей использовали методику, описанную Кларк-Уолкером, которая основана на применении этидия бромида /ЭтБр/, как ингибитора нуклеаз. После разрушения дрожжей в присутствии ЭтБр дифференциальным центрифугированием получали фракцию митохондрий, из которой выделяли ДНК. Дальнейшая очистка мтДНК была достигнута фракционированием препарата в градиенте CsCl -ЭтБр.

На рис. I представлена схема типичного распределения ДНК, выделенной из фракции митохондрий дыхательно-компетентного штамма ПГ-60 (α/α , ade_2/ade) после ультрацентрифугирования в цезиево-этидиевом градиенте. Зона I соответствует

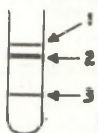


Рис. I. Схема флуоресцентной фотографии пробирки с ДНК, выделенной из митохондрий штамма ПГ-60 после фракционирования в градиенте CsCl -ЭтБр. /Объяснения в тексте/.

линейной мтДНК, зона 2 соответствует ядерной ДНК дрожжей, самая нижняя зона 3 соответствует фракции ковалентнозамкнутых молекул. У дрожжей-сахаромикетов известен только один класс молекул ДНК, который выделяется в ковалентнозамкнутой форме, это - одНК или 2 мк ДНК, имеющая цитоплазматическую локализацию. Если мтДНК у дрожжей существует в виде кольцевых молекул, то, естественно, она должна выделяться в CsCl -ЭтБр градиенте вместе с фракцией молекул одНК. Исходя из этого соображения поиск кольцевой мтДНК проводили в препарате из зоны 3 после удаления ЭтБр и CsCl .

Прежде всего препарат кольцевых молекул был подвергнут фракционированию в нейтральном градиенте CsCl . Распределение препарата ковалентнозамкнутой ДНК петергофского штамма ПГ-60

представлено на рис. 2.

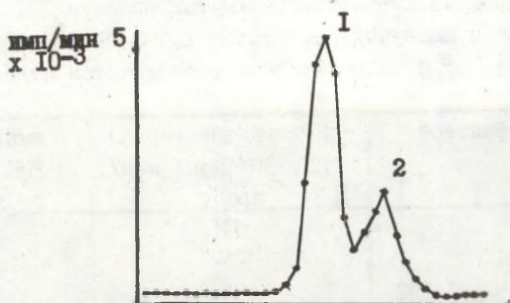


Рис. 2. Распределение фракции ковалентнозамкнутых молекул в градиенте CsCl .

Видно, что данный препарат представлен популяцией двух классов молекул, различающихся по плавучей плотности. Плотность основного пика /пик 1/ составляет $1,698 \text{ г/см}^3$, что соответствует плавучей плотности одНК. Плотность минорного пика 2 составляет $1,684 \text{ г/см}^3$, т.е. идентична плавучей плотности линейной мтДНК. Отметим здесь, что другими авторами гетерогенности фракции ковалентнозамкнутых молекул ДНК дрожжей по нуклеотидному составу зарегистрировано не было.

Для идентификации минорного компонента с плавучей плотностью $1,684 \text{ г/см}^3$ оба пика были отобраны отдельно и анализировались с помощью молекулярной гибридизации, а также электронномикроскопически. В таблице I представлены данные по гибридизации ДНК из пиков 1 и 2 на рис. 2 с радиоактивным транскриптом, полученным на очищенной матрице линейной мтДНК дрожжей *in vitro*.

Из таблицы видно, что минорный пик с плотностью $1,684 \text{ г/см}^3$ идентичен мтДНК дрожжей.

Оценка длины кольцевых молекул мтДНК проводилась с помощью электронной микроскопии. Было установлено, что длина кольцевых молекул мтДНК составляет 25 мк.

Таким образом, на основании трех независимых критериев: плавучей плотности, гибридизации с транскриптом линейной мтДНК и измерения контурной длины, обнаруженная нами минор-

Таблица I

Гибридизация ковалентнозамкнутых молекул ДНК дрожжей с плавучей плотностью $1,698 \text{ г/см}^3$ и $1,684 \text{ г/см}^3$ с радиоактивным транскриптом мтДНК

№	ДНК на фильтре	^3H -комплементарная РНК, 10^5 имп/ мин/ пробу	имп/мин РНК в гибриде
1	бланк	РНК	70
2	1 мкг мтДНК	— " —	14680
3	20 мкг ДНК р ⁺ pI92	— " —	260
4	1 мкг мтДНК крысы	— " —	60
5	ДНК пика $1,684 \text{ г/см}^3$	— " —	6380
6	ДНК пика $1,698 \text{ г/см}^3$	— " —	920

ная фракция кольцевых молекул, выделяющая из препарата митохондрий дыхательно-компетентного штамма ПГ-60, может быть идентифицирована как интактная мтДНК. Неудача выделения таких молекул другими авторами может объясняться либо линейными особенностями дрожжей, либо неадекватностью используемых методов.

3 μm ДНК - НОВАЯ ПЛАЗМИДА ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE*

Ларионов В.Л., Гришин А.В.

Ленинградский государственный университет, Ленинград

К настоящему времени у дрожжей-сахаромикетов известно два класса цитоплазматических ДНК. Это митохондриальная ДНК /мтДНК/ с контурной длиной нативных молекул 25 мк и омикронная ДНК/одНК/ длиной около 2 мк. МтДНК дрожжей выделяется преимущественно в форме линейных молекул, тогда как одНК выделяется из дрожжей в ковалентно-замкнутой форме. Функция мтДНК в биогенезе митохондрий дрожжей выяснена довольно пол-

но, иначе обстоит дело с другой плазмидой-одНК, роль которой в клетке до сих пор остается неясной.

В настоящем сообщении представлены данные, свидетельствующие о существовании у дрожжей-сахаромикетов нового класса цитоплазматической ДНК, отличного от мтДНК и одНК. Новая плазида была обнаружена при тестировании петергофской коллекции дрожжей на присутствие одНК.

Для выделения плазмидной ДНК дрожжей использовали описанную Кларк-Уолкером методику с некоторыми модификациями. 10 г дрожжей суспендировали в 20 мл буфера А, содержащего бромистый этидий /ЭтBr/, 0,5 М сорбит, 0,01 М трис, 0,01 М ЭДТА pH 7,4 и разрушали со стеклянными бусами Ø 0,5 мм в течение 40 сек на максимальной скорости в дезинтеграторе Брауна. Полученный гомогенат разбавляли в 3 раза буфером А и центрифугировали при 2-3 тыс г для удаления неполностью разрушенных клеток. Отобранный супернатант повторно центрифугировали при 10-15 тыс в течение 30 мин для получения мембранной фракции, обогащенной плазмидной ДНК. Образовавшийся осадок суспендировали в 4 мл буфера, содержащего 0,15 М NaCl, 0,02 М ЭДТА, 0,05 М трис-HCl pH 8,5 и лизировали добавлением додецилсаркозилата Na до к/к 1%. Все описанные операции проводились на холоде. К полученному лизату прибавляли CsCl до значения показателя преломления 1,392. Просветленный ультрацентрифугированием лизат переносили в полиалломерные пробирки ротора Ti 50 и подвергали равновесному ультрацентрифугированию при 40 тыс об/мин и температуре +15°C.

На рис. 1 дана денситограмма негатива флуоресцентной фотографии пробирки, содержащей ДНК, полученной из мембранной фракции петергофского штамма дрожжей 6-П-П188 (ahis 7-1 1789) после фракционирования в градиенте CsCl - ЭтBr. Самый легкий пик I соответствует линейной мтДНК, пик II соответствует ядерной ДНК, пик III соответствует фракции ковалентно-замкнутых молекул. Пик III был отобран и после освобождения от ЭтBr и CsCl подвергнут дальнейшему анализу.

На рис. 2 даны схемы электрофореграмм ДНК из III пика в 1% агарозном геле /а/ до и /б, в/ после расщепления рестрик-

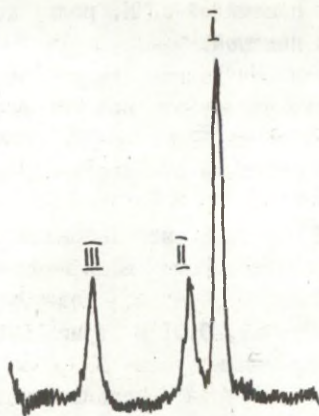


Рис. 1. Фракционирование ДНК мембранной фракции штамма 6-ІГ-ПІ88 в градиенте CsCl -ЭтБр. /Объяснение в тексте/

тазами EcoR1 и Hind III . На этом же рисунке для сравнения приведены электрофореграммы одНК, полученной из другого штамма І5В-П4, содержащего одНК /г/ до и /д,е/ после расцеп-

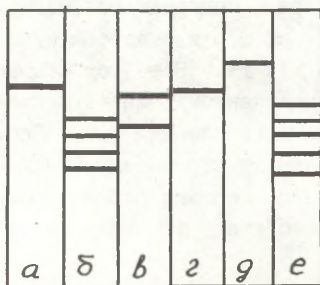


Рис. 2. Рестрикционный спектр плазмидных ДНК дрожжей. Дорожки а, б, в соответствуют плазмиде штамма 6-ІГ-ПІ88, дорожки г, д, е - одНК штамма І5В-П4 /Объяснения в тексте/

ления рестриктазами EcoR1 и Hind III . Видно, что полученная из штамма 6-ІГ-ПІ88 плазмидная ДНК существенно отличается от одНК І5В-П4, которая идентична описанным в литературе одНК. Молекулярный вес этой новой ДНК, рассчитанный на основании электрофоретической подвижности, составляет около 9000 пар оснований, что соответствует длине молекулы 3 мк, т.е. новая плазида почти в 1,5 раза больше одНК. При расщеплении 3 мк плазмиды рестриктазой EcoR1 получается 4 фрагмента, в то время как одНК петергофских штаммов дрожжей имеет только

один сайт расщепления этим ферментом. При расщеплении 3 мк ДНК рестриктазой *Hind* III получается 2 фрагмента, тогда как одНК расщепляется на 5 фрагментов.

Окончательное доказательство уникальности нового класса молекул было получено в экспериментах по молекулярной гибридизации 3 мк ДНК с радиоактивными транскриптами, синтезированными *in vitro* РНК-полимеразой *E. coli* на матрицах мтДНК и одНК. Данные этих опытов представлены в таблице. Из таблицы видно, что 3 мк ДНК практически не имеет общих последова-

Таблица
Гибридизация радиоактивных транскриптов
мтДНК и одНК с различными цитоплазматическими ДНК дрожжей-сахаромицетов

№ п/п	ДНК на фильтре	³ H-комплементарная РНК /5.10 ⁴ имп/мин/пробу/	имп/мин РНК в гибриде
1.	Без ДНК	мтРНК	40
2.	20 мкг суммарной ДНК р ^о р192-15В-П4	мтРНК	200
3.	0,6 мкг мтДНК	мтРНК	20000
4.	0,6 мкг одНК	мтРНК	100
5.	0,6 мкг 3 мк ДНК	мтРНК	700
6.	20 мкг суммарной ДНК	оРНК	180
7.	0,6 мкг одНК А269	оРНК	12000
8.	0,6 мкг мтДНК	оРНК	200
9.	0,6 мкг 3 мк ДНК	оРНК	120

тельностью ни с мтДНК, ни с одНК. Незначительный уровень гибридизации с транскриптом мтДНК, очевидно, объясняется присутствием в препарате 3 мк ДНК некоторого количества мтДНК, часть которой, как нами было показано ранее, может выделяться в ковалентно-замкнутой форме при разрушении дрожжей в присутствии ингибитора нуклеаз - ЭТбр.

У дрожжей *S. cerevisiae* известен ряд цитоплазматических

детерминант / ψ ,ure 3, устойчивость к ряду антибиотиков и др./, которые не определяются ни мтДНК, ни одНК. Описанная в данной работе 3 мк ДНК, по-видимому, может рассматриваться как возможный кандидат на роль одной из этих детерминант.

Гибридизацию проводили на цитроцеллюлозных фильтрах в присутствии формамида /35% для мтРНК и 50% для оРНК/ при 40° в течение 20 час. Штамм 5° р192-15В-П4 полностью утратил мтДНК, штамм А269 не содержит одНК.

ПОВЕДЕНИЕ Rts1 -ПЛАЗМИДЫ *PROTEUS VULGARIS* В ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ХОЗЯЕВАХ

Лобанок Т.Е., Песнякевич А.Г., Фомичев Ю.К.
Минский опорный пункт Всесоюзного научно-исследовательского института генетики и селекции
промышленных микроорганизмов, Минск

Бактерии рода *Erwinia*, в отличие от большинства других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, по-видимому, не обладают собственными конъюгативными плазмидами лекарственной устойчивости. Однако, как было показано рядом исследователей, они способны воспринимать при конъюгации, хотя и с низкой частотой R-плазмиды других бактерий. При этом воспринятые плазмиды характеризуются слабой степенью стабильности в новом хозяине, а клетки *Erwinia*, воспринявшие R-плазмиды, не всегда оказываются способными передавать их в последующих скрещиваниях. Кроме того, фенотипическое выражение признака лекарственной устойчивости, детерминированного перенесенной плазмидой, в клетках *Erwinia* часто отличается от его выражения в исходном штамме.

Вышеизложенные факты явились основанием для изучения поведения в клетках *Erwinia* R-плазмид других бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, в частности Rts1- плазмиды, детерминирующей устойчивость к канамицину, и относящейся к Т группе несовместимости. Естественным хозяином этой плазмиды является *Proteus vulgaris*. Характерной особенностью Rts1-

плазмиды является ее термочувствительность, выражающаяся в снижении частоты передачи, если скрещивание осуществляется при температуре 37°.

В результате проведенного исследования установлено, что II из 13 изученных штаммов *Erwinia* воспринимают при конъюгации плазмиду от донорского штамма *E. coli* K12 с частотой от 10^{-7} до 10^{-3} в пересчете на клетку донора, в то время как реципиентные бактерии *E. coli* при скрещивании с этим же донорским штаммом воспринимают данную плазмиду со значительно более высокой частотой порядка 10^{-2} - 10^{-1} , если скрещивание осуществляется при температуре 28°.

Восприятие *Rts1*-плазмиды клетками *Erwinia* сопровождалось приобретением последними устойчивости к канамицину, уровень которой существенно превышал таковой исходного донорского штамма *E. coli* K12 CSH-2 и бактерий *Proteus*. R^{+} -трансконъюганты *Erwinia* характеризовались высокой степенью стабильности наследования *Rts1* - плазмиды и не утрачивали ее ни спонтанно, ни после обработки акрифлавином. Более того, данная плазида сохранялась в клетках *Erwinia*, растущих при температуре 42°, в то время как бактерии *E. coli* утрачивали ее при этой температуре с частотой, достигающей 100%.

Клетки *Erwinia*, несущие воспринятую *Rts1*- плазмиду, были способны передавать ее при конъюгации как гомологичным *Erwinia* /, так и гетерологичным *Escherichia* / бактериям. Причем последним она передавалась с более высокой частотой $/10^{-4}$ - $10^{-2}/$, чем в гомологичных скрещиваниях *Erwinia* x *Erwinia* /, где частота передачи составляла 10^{-7} - 10^{-3} .

Изучение динамики переноса *Rts1*- плазмиды в различных конъюгационных системах показало, что передача ее от исходного донора (*E. coli*) реципиентным бактериям рода *Erwinia* осуществляется на плотной среде, о чем свидетельствует отсутствие зависимости частоты передачи от времени скрещивания, а также тот факт, что разведение смеси скрещиваемых бактерий перед высевом на селективную среду вызывает непропорциональное уменьшение частоты его переноса. В то же время R^{-} - транс-конъюганты *Erwinia* передают указанную плазмиду как гомологичным, так и гетерологичным бактериям в жидкой питательной

среде. При этом независимо от того, какой штамм выступает в роли реципиента, частота переноса Rts1 - плазмиды возрастает с увеличением времени скрещивания, а сама передача регистрируется после 15-ти минутного контакта скрещиваемых клеток.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что Rts1- плазида, хозяином которой является *Proteus vulgaris*, не только может восприниматься бактериями *Erwinia* различных видов, но и стабильно наследоваться ими. Однако на поведение указанной плазмиды в значительной степени влияет клетка-хозяин, о чем свидетельствуют некоторые различия в стабильности и фенотипическом выражении Rts1 - фактора в гетерологичных бактериях.

ПЛАЗМИДА pKMR77 И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КУЛЬТУРЫ, НЕСУЩЕЙ ЕЕ, К ФАГУ KM2

Манувахова М.Ш., Коротяев А.И., *Рейнгольд В.Н.

*Шестопалова Н.М., **Домарадский И.В.

Кубанский медицинский институт им. Красной Армии,
Краснодар; * Институт полиомиелита и вирусных
энцефалитов, Моск. обл.; ** Всесоюзный научно-иссле-
довательский институт биосинтеза белковых веществ,
Москва

Одним из важнейших свойств R-плазмид является их способность наделять клетку-хозяина чувствительностью к донор-специфическим фагам. Поиск новых вариантов R-плазмид у диких штаммов семейства *Enterobacteriaceae* и фагов, обладающих донорспецифическими свойствами в отношении культур с этими плазмидами - одно из условий дальнейшего совершенствования методов идентификации R-факторов.

В связи с этим в работе поставлена задача выявить у дикого штамма семейства *Enterobacteriaceae* конъюгативную плазмиду, охарактеризовать ее и использовать в качестве объекта для выделения донорспецифического фага, а также изучить

круг его хозяев среди культур со стандартными плазмидами.

Плазмида **pKMR77** была выделена из штамма *Shigella flexneri* и определяла устойчивость к стрептомицину /200 мкг/мл/, тетрациклину /100 мкг/мл/, хлорамфениколу /200 мкг/мл/. С целью изучения конъюгативности плазмиды создавали конъюгационные системы по методу *Watanabe, Fukasawa* /1961/. Плазмида передавалась с частотой $1 \cdot 10^{-7}$. При изучении групп сцепления маркеров установлено, что **pKMR77** передается либо единой группой сцепления, либо переносится только признак устойчивости к стрептомицину.

Способность штамма кишечной палочки, содержащей плазмиду **pKMR77**, поддерживать размножение фагов ϕ 8, ϕ 1, ϕ 2, PR4 исследовали с помощью спот-теста и титрованием по Грациа. Ни один из перечисленных фагов не оказался способным лизировать культуру с этой плазмидой. **pKMR77** является ϕ in⁻, не ограничивает размножение фагов λ , T3, T7.

ДНК плазмиды **pKMR77**, выделенную методом равновесного центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия, использовали для трансформации двух штаммов кишечной палочки. Удалось получить трансформанты, несущие устойчивость к стрептомицину, другие маркеры при трансформации не передавались.

При изучении электрофоретической подвижности плазмидной ДНК обнаружены две полосы поглощения в ультрафиолетовом свете.

Все эти данные позволяют предположить, что плазмида **pKMR77** является комплексом по крайней мере двух совместимых плазмид.

Из сточных вод выделен фаг KM2, который не обладал способностью размножаться в штамме кишечной палочки, не содержащем плазмид, но приобретал такую способность при введении в него плазмиды **pKMR77**. Изучен круг хозяев фага среди различных штаммов *E. coli*, в том числе несущих плазмиды I8 известных групп несовместимости соответственно. Ни одна из проверенных стандартных плазмид не придавала штамму способности поддерживать размножение фага KM2.

Методом электронной микроскопии исследованы морфология и способ адсорбции фага на клетке. KM2 имеет головку, кото-

рая по форме напоминает головку Т-четных фагов, и отросток, с помощью которого прикрепляется к поверхности клетки. Фаг не способен адсорбироваться на клетках, не содержащих плазмиду **pKMR77** и не образующих донорных ворсинок, что подтверждает наличие у него донорспецифических свойств.

В связи с тем, что фаг KM2 не лизирует культуры кишечной палочки, несущие стандартные плазмиды I8 проверенных **Inc** - групп, но обладает донорспецифическими свойствами в отношении плазмиды **pKMR77** можно предположить, что последняя /последние/ не относится ни к одной из этих групп несовместимости.

УЧАСТИЕ **Inc** P-I ПЛАЗМИДЫ R638 В ПЕРЕНОСЕ ХРОМОСОМНЫХ МАРКЕРОВ

Минина Т.С., Андреевская Е.А., Домарадский И.В.
Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

IncP-I плазмиды Р, имеющие широкий диапазон вторичных хозяев среди грамотрицательных бактерий, представляют большой интерес для генетики микробов и особенно для изучения процессов мобилизации хромосомных генов.

В ранее опубликованных работах /Домарадский и сотр., 1976; Филькова и сотр., 1977; Минина и сотр., 1978/ приводились данные, касающиеся межродовой передачи хромосомных генов, опосредованной в основном плазмидой RI8. В этих работах обращалось внимание на то, что перенос хромосомных маркеров удавалось констатировать, как правило, при селекции трансконъюгантов на минимальных средах без той или иной аминокислоты; у трансконъюгантов, отбиравшихся на средах с антибиотиками, неселективные метки /хромосомные/, если и выявлялись, то исключительно редко. Мы предположили, что сказанное обстоятельство зависело от свойств самих плазмид. Поэтому для настоящей работы мы использовали другую плазмиду из той же группы несовместимости - R638. Донором ее служил

штаммы синегнойной палочки PAO ML 4600.

Вначале было установлено, что реципиентам - штаммам GA - 87, MB101 и C кишечной палочки плаزمиды R638 передается с гораздо большей частотой, чем другие Inc P-I плазмиды R.

Далее выяснилось, что при скрещивании PAO ML 4600 с GA - 87 или AB2463 перенос плазмиды R638 в заметном проценте случаев сопровождается передачей хромосомных маркеров /обычно arg^+ /.

При последующем использовании "межродовых" трансконъюгантов в качестве доноров обратил на себя внимание тот факт, что в кроссах GA-87 / $R^+ arg^+$ / x CSH-57 частота совместной передачи плазмиды R и хромосомных маркеров была необычно высокой /до 40%/ и намного превышала таковую при скрещивании AB2463 / $R^+ arg^+$ / с тем же реципиентом. В то же время частота передачи плазмиды R638 была выше /примерно в 20 раз/, если в качестве донора выступал AB2463 / $R^+ arg^+$ /.

Делается предварительный вывод, что частота совместного переноса Inc P-I плазмид и хромосомных маркеров не зависит от частоты передачи самих плазмид, а, по-видимому, определяется другими генетическими особенностями плазмид /наличием у них Cma признака по Холлоуэу?/.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДНК ПЛАЗМИДЫ ГЕМОЛИЗА, МЕЧЕНОЙ ТРАНСПОЗОМАМИ TnI и $TnIO$, НА РАЗНЫХ ВИДАХ БАКТЕРИЙ

Могильская С.П., Иванова З.А., Исаевич Л.В.,

Филькова Э.В., Домарадский И.В.

Всесоюзный научно-исследовательский институт

биосинтеза белковых веществ, Москва

До сих пор возможность обмена генетической информацией между различными псевдомонадами и другими бактериями ограничена преимущественным применением конъюгативных Inc P-I плазмид резистентности. Поэтому с целью расширения диапазона передаваемой генетической информации, в частности от кишечной палочки псевдомонадам, был использован необычный для

этого рода тип передачи - трансформация. Ранее нами была осуществлена трансформация нескольких штаммов рода *Pseudomonas*, изолированными ДНК различных R факторов /pCR, pMB9, pAL R-2, R6K, RPI/. Представляло интерес изучить возможность введения в эти штаммы других ДНК, в частности, ДНК плазмиды гемолиза HlyI95. В связи с трудностью отбора рекомбинантов при различных методах введения плазмид гемолиза, в настоящей работе использована ДНК плазмиды гемолиза HlyI95, несущей транспозоны TyI или $TyIO$. Это дало возможность осуществлять селекцию трансформантов как по признаку устойчивости к антибиотикам, так и по их способности вызывать гемолиз. Представляются данные по сравнительному изучению биологической активности ДНК указанных плазмид в клетках кишечной палочки и псевдомонад.

ПЕРЕНОС ПЛАЗМИД ГРУППЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ R В КЛЕТКИ МЕТАНОЛУСВАИВАЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS METHANOILICA*

Наумов Г.Н., Керопиан Е.А., Зенцова О.А., *Домарадский И.В.
Северо-Кавказский филиал всесоюзного научно-исследовательского института синтеза белка, Краснодар;
*Всесоюзный научно-исследовательских институт биосинтеза белковых веществ, Москва

Высокоэффективным вектором для передачи генетического материала у бактерий могут служить конъюгативные плазмиды RPI /RP4/ и R68.45, относящиеся к группе несовместимости R. Эти плазмиды, выделенные из *Pseudomonas aeruginosa*, несут признаки устойчивости к ампициллину /Ap/, канамицину /Km/, тетрациклину /Tc/ и могут передаваться широкому кругу грам-отрицательных микроорганизмов более чем 15 родов (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Proteus* и др.) /Домарадский И.В., 1978/. Ценным качеством этих плазмид является способность мобилизовать хромосомную ДНК причем участки ее, включенные в плазмиду,

реплицируются и транскрибируются в новом хозяине, обеспечивая таким образом экспрессию внесенных генов. Особенно сильно эта способность проявляется у варианта плазмиды R68 - R68.45, который способен переносить различные довольно большие фрагменты хромосомы /10-30 мин. длины хромосомной карты/ *Ps. aeruginosa*. В связи с этим плаزمида RPI была использована для картирования хромосомы *Rhizobium* /Meade, Signer, 1977/, а плазмида R68.45 - *Ps. aeruginosa* /Haas, Halloway, 1978/. Плазмида RP4 успешно была использована также для получения в автономном состоянии генов азотфиксации /nif-оперона/ Cannon, Postgate, 1976/. Авторы получили гибридную плазмиду PP4I и наблюдали выражение nif-генов в клетках реципиентов, получивших ее при конъюгации. Другим ценным свойством RP-плазмид является наличие у них только одного сайта рестрикции рестриктазой *EcoRI*, что делает их пригодными для конструирования рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*.

Таким образом, плазмиды RPI и R68.45 могут быть с высокой эффективностью использованы как для картирования генов на хромосоме у различных бактерий, так и для конструирования штаммов микроорганизмов, обладающих полезными свойствами.

В настоящей работе была предпринята попытка передать при помощи конъюгации плазмиды RPI и R68.45 в клетки факультативного метилотрофа *Pseudomonas methanolica*, чтобы в последующем провести перевод в автономное состояние /в составе плазмид/ генов утилизации метанола.

В качестве реципиента был использован прототрофный штамм *Ps. methanolica* ВКМ-В-II3I, в качестве доноров ауксотрофные штаммы *E. coli* AB1157(RP1) и *E. coli* J53 (R68.45). Реципиентом для переноса плазмид из трансконъюгантов *Ps. methanolica* служила *E. coli* ЕС 329/74. В работе были использованы плазмидоспецифические фаги PRRI, RBI и PRD. Конъюгацию осуществляли по общепринятой методике в L-бульоне. Клетки из конъюгационной смеси осаждали центрифугированием, отмывали стерильным 0,14 М раствором NaCl, суспендировали в исходном количестве раствора NaCl и после разведений высевали на пластинки минимального агара с метанолом /0,5 об%/, содержащего антибиотика. В качестве селективного агента использовали Ap и Km по 50 мкг/мл и Tc - 25 мкг/мл. В качестве трансконъюгантов от-

бирали типичные для *Ps.methanolica* розовые колонии, растущие на пластинках минимального агара с антибиотиками. Чувствительность к плазмидоспецифическим фагам проверяли при помощи спот-тестов.

Был осуществлен конъюгационный перенос плазмид RPI и R68.45 в клетки факультативного метилотрофа *Ps. methanolica*. Частота переноса плазмиды RPI варьировала в пределах от 10^{-4} до $1,5 \cdot 10^{-7}$. С наибольшей частотой при конъюгации передавался маркер *amp* $2,5 \cdot 10^{-4}$ - $1,1 \cdot 10^{-5}$; *kan* и *tet*-маркеры передавались с более низкой частотой $2,3 \cdot 10^{-7}$ - $1,5 \cdot 10^{-7}$ и $3,9 \cdot 10^{-6}$ - $3,5 \cdot 10^{-7}$ соответственно/.

С еще более низкой эффективностью передавалась плазмида R68.45. *amp*-маркер передавался с частотой $5,2 \cdot 10^{-4}$ - $7,5 \cdot 10^{-6}$, *kan*-маркер - $5,6 \cdot 10^{-8}$ и *tet*-маркер - $2,8 \cdot 10^{-7}$. Следует отметить, однако, что низкая частота переноса в жидкой среде вообще характерна для плазмид Р-группы несовместимости, которые лучше передаются при конъюгации на плотной питательной среде. Признаки резистентности передавались несколькими группами сцепления. У плазмиды RPI - *ApKmTc* - 25%, *ApKm* - 32,4%, *KmTc* - 25,6% и *Km* - 17,0%; а у плазмиды R68.45 - *ApKmTc* - 70,6%, *ApKm* - 20,6%, *KmTc* - 8,8%. Изучение фенотипических проявлений детерминантов резистентности показало, что трансконъюганты хорошо росли при концентрации *Ap* и *Km* в среде 200 мкг/мл, а *Tc* - 50 мкг/мл.

С целью доказательства присутствия плазмид RPI и R68.45 в клетках трансконъюгантов *Ps.methanolica* был проведен перенос плазмид посредством конъюгации в клетки реципиентного штамма *E.coli* ЕС 329/74. В качестве трансконъюгантов *E.coli* отбирали вырастающие на МПА с антибиотиками через сутки /колонии *Ps.methanolica* появляются через 3-4 суток/ бесцветные колонии с типичной для кишечной палочки морфологией, которые проверяли затем на среде Эндо. Несущие все три маркера резистентности трансконъюганты *Ps.methanolica* оказались высокоэффективными донорами: они передавали плазмиды в клетки кишечной палочки с частотой 10^{-1} - 10^{-2} .

Полученные трансконъюганты *Ps.methanolica*, несущие плазмиды RPI и R68.45, лизировались в спот-тестах специфическими

для плазмид Р-группы несовместимости фагами PRRI, RPI, PRD.

В настоящее время предпринимаются попытки выделения из трансконъюгантов *Ps.methanolica* плазмидной ДНК при помощи гель-хроматографии на сефарозе 4В с целью проверки ее трансформирующей активности.

Таким образом, удалось осуществить конъюгационный перенос плазмид Р-группы несовместимости RPI и R68.45 из клеток *E. coli* в клетки факультативного метилотрофа *Ps.methanolica*. Полученные трансконъюганты будут использованы для поиска клонов, несущих гены утилизации метанола в составе указанных плазмид в автономном состоянии.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ ПЛАЗМИДЫ CoIE1 МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Наумова Г.Н., Александров А.А., Голованов Е.И.

Институт молекулярной генетики, Москва

Одной из задач изучения плазмид является исследование их транскрипции. В данной работе изучали транскрипцию плазмиды CoIE1. С этой целью применили метод электронной микроскопии для наблюдения полученных *in vitro* комплексов ДНК CoIE1 с синтезируемыми на них молекулами РНК. Для получения комплексов использовали методику, описанную в /Botchan, 1976/. Инкубационная смесь содержала 25 мМ ТЭА-НСI /рН 7,9 при 25°C/, 10 мМ хлористого магния, 0,2 М хлористого калия, по 0,1 мМ ЭДТА и ДТТ, по 0,4 мМ АТФ, ГТФ, УТФ и ЦТФ. Концентрация ДНК составляла 50 мкг/мл, молярное соотношение РНК-полимераза/ДНК варьировалось в различных опытах в диапазоне 2+2,5. При 37°C в течение 5 минут смесь преинкубировали с ферментом в присутствии трех трифосфатов. после чего добавлением четвертого трифосфата начинали транскрипцию. Время синтеза составляло 30-35 секунд. Далее синтез останавливали и комплексы фиксировали разведением инкубационной смеси в два раза раствором, содержащим 25 мМ ТЭА-НСI /рН 7,9 при 25°C/, 0,1 мМ ЭДТА, 0,4% формальдегида /таким образом конечная концентра-

ция формальдегида при фиксации составляла 0,2%. Полученную смесь прогревали при 37°C в течение 5 минут, после чего переносили в комнатную температуру. В тех опытах, где изучали транскрипцию суперспиральной формы, после фиксации комплексов формальдегидом проводили 2-х часовой диализ с последующей обработкой рестриктазой EcoRI /условия рестрикции: 0,1 М Трис-HCl pH 7,5 при 37°C, 10 mM хлористого магния, 50 mM хлористого натрия/.

Для визуализации комплексов в электронном микроскопе готовили раствор: 0,1 М Трис-HCl /pH 8,4 при 25°C/, 0,01 М ЭДТА, 50 + 70% формамида, 50 мкг/мл цитохрома C, 2+4 мкг/мл ДНК. Препарат наносился на покрытые коллодиевой пленкой-подложкой медные сетки, которые затем промывались в 96% этаноле и высушивались на воздухе. Далее препараты оттеняли напылением платиной под углом 8°. Работа проводилась на электронном микроскопе JEM-7 при ускоряющем напряжении 80 кВ, увеличении 10000х.

Непосредственной целью работы являлось картирование промоторов плазмиды ColEI. Его вели относительно сайта рестрикции EcoRI. При анализе в электронном микроскопе наблюдали линейные молекулы ДНК с различным количеством находящихся на них молекул РНК. Местоположение промоторов определяли экстраполяцией длин находящихся на ДНК молекул РНК к нулю. Поскольку заранее неизвестно, в какую именно сторону идет синтез молекулы РНК, для каждой рассматриваемой молекулы получали две точки возможного начала синтеза. Выбор верного варианта осуществляли на основе статистического анализа большого массива комплексов ДНК/РНК с использованием системы HP 9825A.

Для выяснения роли суперспиральности ДНК в регуляции синтеза РНК сравнивали транскрипцию линейной /EcoRI/ и суперспиральной форм исследуемой ДНК.

На линейной /EcoRI/ форме ДНК ColEI обнаружили две промоторные области. Первая расположена в непосредственной близости от сайта рестрикции EcoRI, а расстояние между второй и сайтом составляет примерно 20% от общей длины ДНК, причем синтез с нее идет по направлению к сайту.

На суперспиральной ДНК удалось дополнительно обнаружить еще одну, третью промоторную область. Присутствие первой из вышеуказанных областей на суперспиральной ДНК доказывает, что обнаружение ее на линейной ДНК не является артефактом, обусловленным сродством РНК-полимеразы к полинуклеотидным концам.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ГИБРИДНЫХ ПЛАЗМИД, НЕСУЩИХ ДЕТЕРМИНАНТУ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Нумеров В.К., Рудченко О.Н.,
Левина Н.Б., Домарадский И.В.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

Применяя в качестве вектора плазмиду pBR322 /Ap Tc/ с использованием рестриктазы *Sal*I сконструирован ряд гибридных плазмид, несущих ген/ы/ гемолитической активности *E.coli*. Источником детерминанты гемолитической активности послужила Hly-плазида pIP24I с молекулярным весом 38 мегадальтон. С помощью трансформации Hly-штамма *E. coli* гибридными плазмидами показано, что ген/ы/ гемолитической активности экспрессируются в составе гибридных плазмид. По данным электронной микроскопии молекулярный вес гибридных плазмид равен 12-13 мегадальтон, а, значит, детерминант гемолитической активности изолирован на *Sal*I-фрагменте в 10 мегадальтон. Отмечается увеличение продукции гемолизина штаммами, несущими гибридные плазмиды, в сравнении с тем же штаммом с родительской плазмидой pIP24I. Возможно, это связано с эффектом дозы гена, т.к. гибридные плазмиды находятся под ослабленным контролем репликации. Показана нестабильность большинства гибридных плазмид в неселективных условиях. Обсуждается возможность уменьшения размеров фрагмента, несущего детерминанту гемолитической активности.

СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К НИТРОФУРАНОВЫМ ПРЕПАРАТАМ У КИШЕЧНЫХ БАКТЕРИЙ

Оленина Н.А.

Саратовский государственный медицинский институт, Саратов

Изучен элиминирующий эффект акрифлавина у 21 штамма кишечных бактерий клинического происхождения, устойчивых к фурацилину, фурагину и фуразолидону.

Под действием элиминирующего агента потеря нитрофуранорезистентности наблюдалась у 71% штаммов, причем у большинства из них одновременно ко всем трем препаратам. Наибольшая частота элиминации нитрофуранорезистентности отмечена у кишечных палочек /до 72%/ и сальмонелл /до 30%/.

Удлинение срока инкубации бактерий в среде, содержащей акрифлавин, до 72 часов приводило к повышению количества чувствительных клеток в популяции.

ФИЗИЧЕСКИЕ РАЗМЕРЫ ПЛАЗМИДЫ, КОНТРОЛИРУЮЩЕЙ НИТРОФУРАНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ У КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК

Оленина Н.А., *Лушников А.А.,

Шендеров Б.А., *Домарадский И.В.

Саратовский государственный медицинский институт,
Саратов; *Всесоюзный научно-исследовательский ин-
ститут биосинтеза белковых веществ, Москва

Ранее нами было обнаружено широкое распространение в клиническом материале грамотрицательных бактерий, устойчивых к фурацилину, фуразолидону и фурагину.

В настоящей работе представлены данные изучения физических размеров нитрофурановой плазмиды, выделенной из двух штаммов кишечных палочек клинического происхождения, признак нитрофуранорезистентности которых передавался реципиентным кишечным палочкам при конъюгации, трансдукции и трансформации.

Приведены результаты электронномикроскопического изучения препаратов плазмидной ДНК из этих штаммов.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МЕМБРАНОЙ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК В ПРОЦЕССЕ РЕПЛИКАЦИИ В МИНИ-КЛЕТКАХ

Перебитых А.Н., Воронин А.М.
Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов АН СССР, г. Пущино

В настоящее время все более актуальным при исследовании механизмов репликации плазмидной ДНК становится вопрос о роли в этом процессе ДНК - мембранных и ДНК - белковых взаимодействий. Как было показано многочисленными исследованиями, хромосома *E.coli* /и целого ряда других микроорганизмов и простейших/ при лизировании лизоцимных сферопластов неионными детергентами выделяется в виде т.н. "хромоида", структуры, состоящей из ДНК-мембранного комплекса. Далее было обнаружено существование структур более сложного характера, подобных "нуклеосомам" эукариот, при исследовании кинетики лизирования детергентом Тритон X100. Последняя особенность имеет очевидное значение при рассмотрении такого фундаментального процесса, как эволюционный.

Данные, полученные в работах по изучению соосаждения плазмидной ДНК с бактериальной хромосомой в комплексе с мембранными структурами, позволяют предположить, что аналогичные структурные состояния, в той или иной мере связанные с циклом репликации, существуют и в случае бактериальных плазмид. Однако при наличии такого рода взаимодействий, исследования репликации плазмидной ДНК на уровне ДНК-мембранных /белковых/ взаимодействий в бактериальной клетке в определенной степени затруднены. Использование ионных детергентов, в частности, додецилсульфата натрия (SDS), позволяет отделить бактериальную хромосому от пула плазмидной ДНК что, в свою очередь, приводит к полному нарушению ДНК-белковых связей. В связи с этим весьма привлекательным объектом явля-

ются ануклеатные системы, /мини-клетки/ с сегрегированными молекулами плазмидной ДНК. Ранее в лаборатории Коэна было показано существование плазмидной ДНК в мини-клетках *E. coli*, в сверхспиральном состоянии, в форме открытых циклов и репликативных интермедиатов. В то же время было отмечено значительное варьирование в относительном выходе различных форм в зависимости от физиологического состояния мини-клеток и условий лизиса. Это свидетельствует об определенной гетерогенности в природе ДНК-мембранных взаимодействий репликативных интермедиатов.

Нами были проведены исследования плазмидной ДНК из мини-клеток *E. coli*, находящейся в свободном состоянии и в комплексе с мембраной. При выполнении данной работы лизоцимные сферопласты очищенных мини-клеток, содержащих R факторы R222 или R6K, лизировали при различных условиях и ДНК-мембранный комплекс отделяли от свободной плазмидной ДНК в ступенчатом /60/20%/ сахарозном градиенте. В отличие от линейного градиента, последний позволяет разделить две фракции ДНК в препаративном масштабе без фракционирования градиента. В данных условиях комплекс ДНК-мембрана седиментировал до раздела концентраций сахарозы, а свободная ДНК оставалась практически на градиенте. При электрофоретическом анализе этих фракций было отмечено, что 1/ при использовании неионных детергентов с увеличением ионной силы раствора наблюдался выход из комплекса с мембраной сверхспиральной ДНК; 2/ полученные таким образом быстроседиментирующие комплексы не входили в агарозный гель без предварительной обработки ионными детергентами. Последнее обстоятельство интересно тем, что позволит использовать относительно простой метод электрофореза для исследования комплексов без применения радиоактивной метки; 3/ в случае R6K, по сравнению с R222, наблюдалось большее содержание сверхспиральной ДНК в свободной фракции. Это является следствием того, что в мини-клетках, как и в родительских, количество молекул R6K больше, чем R222 /1-2 копии на клетку/. Таким образом, имеются молекулы, не участвующие в момент выделения в цикле репликации и не связанные /или связанные слабыми взаимодействиями/ с бактериальной

мембраной. С другой стороны, в случае R222, мы имеем в мини-клетках 1-2 копии плазмидной ДНК. В связи с этим, мини-клетки с R222, т.е. плазмидой, находящейся под "строгим" контролем репликации со стороны хромосомы в бактериальной клетке, являются весьма удобным объектом, поскольку в любой момент изолирования мы имеем молекулы, вовлеченные в ту или иную стадию репликации.

Электронномикроскопическое изучение ДНК-мембранных комплексов показало их морфологическую схожесть с известными комплексами с бактериальной мембраной хромосомальной ДНК. Отмечено структурное отличие компонент комплекса, полученного в присутствии неионного детергента и низкой и высокой ионных сил буфера. Это, очевидно, связано с диссоциацией т.н. гистон-подобных белков, обнаруженных в последнее время в ряде микроорганизмов и связанных со структурой и функционированием бактериальной хромосомы. При исследовании фракции свободной ДНК была обнаружена обогащенность ее сверхспиральными репликативными интермедиатами со сниженной степенью сверхспиральности. Наличие подобных интермедиатов цикла репликации плазмидной ДНК говорит о схожести этого процесса в нормальных и мини-клетках.

Таким образом, использование упомянутых подходов позволяет более детально, на модели мини-клеток, исследовать процесс репликации бактериальных плазмид.

ПЛАЗМИДНАЯ ДНК В ШТАММАХ *PSEUDOMONAS PUTIDA* ЛИНИИ BSA

Перебитюк А.Н., Еремин А.А.,
Борисоглебская А.Н., Воронин А.М.
Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов АН СССР, г. Пушкино

В ряде производных выделенного из почвы штамма *Pseudomonas putida* BS202 /таблица/, растущего на нафталине и салициловой кислоте в качестве единственных источников углерода, обнаружено 5 видов плазмидной ДНК с молекулярными весами

от 25 до 70 мегадальтон.

Плазмида с молекулярным весом 68 мегадальтон по характеру распределения в производных штамма BS202 идентифицирована как описанная нами ранее конъюгативная плазмида NPL-1, контролирующая первичные этапы окисления нафталина. Такой же молекулярный вес имеет мутантная плазмида NPL41, контролирующая конститутивный синтез ферментов окисления нафталина до салициловой кислоты. Показана трансформация плазмидной ДНК 68 мегадальтон штамма *Pseudomonas putida* PpG1 (Y.C.Gunsalus) не способного к росту на нафталине и салициловой кислоте. Полученные трансформанты передают с высокой частотой при конъюгации способность утилизировать нафталин. В таких трансформантах и трансконъюгантах обнаруживается идентичная плазмидная ДНК с молекулярным весом 68 мегадальтон.

Конъюгационный перенос признака утилизации салициловой кислоты (Sal^+) идет с низкой частотой $/10^{-7} - 10^{-8}/\text{кл}$ донора/ в штаммы-реципиенты, не растущие на нафталине и возрастает на 2-3 порядка в реципиенты, растущие на нафталине. Показана трансформация штамма PpG7 NaN^{del} (Y.C.Gunsalus) тотальной плазмидной ДНК, выделенной из штамма BS272. При этом с низкой частотой получают трансформанты, способные расти на салицилате. Трансформанты передают Sal^+ признак при конъюгации с частотой на 3-4 порядка выше по сравнению и исходным штаммом в реципиенты, не растущие на нафталине. Кроме того Sal^+ признак может быть конъюгационно перенесен в штаммы *Pseudomonas aeruginosa* ML4262 и ML4600 (S.Mitsuhashi), в которые перенос Sal^+ признака из исходного штамма не наблюдался.

Изучены гомология выделенных плазмид с помощью эндонуклеаз рестрикции EcoR1 и Sma1.

Таблица

Штаммы бактерий, использованные в работе

Штаммы	Характеристика	Источник получения штаммов
BS202	Nah ⁺ Sal ⁺	коллекция лаборатории
BS203	Nah ⁻ Sal ⁺	спонтанная элиминация NPL-1 из BS202
BS206	Nah ⁻ Sal ⁻	спонтанная потеря Sal ⁺ признака из BS203
BS209	Nah ⁻ Sal ⁻	спонтанный мутант BS202 по салицилат-гидроксилазе
BS225	Nah ⁺ Sal ⁻	спонтанный мутант BS209 по плазмиде NPL-1
BS270	Nah ⁺ Sal ⁺	конъюгационный перенос плазмиды NPL-1 в BS203
BS272	Nah ⁺ Sal ⁺	конъюгационный перенос плазмиды NPL-41 в BS203
BS261	Nah ⁺ Sal ⁻	конъюгационный перенос плазмиды NPL-41 в BS206
BS584	Nah ⁺ Sal ⁻ Cam ⁺	трансформация штамма PpG1 (CAM) met ⁻ (Y.Gunsalus) плазмидной ДНК из штамма BS261
BS585	Nah ⁺ Sal ⁻ Cam ⁺	конъюгационный перенос Nah ⁺ признака из трансформанта BS584 в BS206
BS430	Nah ⁻ Sal ⁺	трансформация штамма PpG1 (NAH ^{del}) met ⁻ (Y.C.Gunsalus) плазмидной ДНК из штамма BS272
BS504	Nah ⁻ Sal ⁺	конъюгационный перенос Sal ⁺ признака из трансформанта BS430 в AC 536 (A.M.Chakrabarty)
BS506	Nah ⁻ Sal ⁺	конъюгационный перенос Sal ⁺ признака из BS203 AC536 (A.M.Chakrabarty)

**MS2-ИНДУЦИРОВАННЫЕ МУТАНТЫ E. COLI ПО F-ФАКТОРУ,
ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕСЯ НАРУШЕНИЕМ РЕГУЛЯЦИИ РОСТА И ДЕЛЕНИЯ**

Перерва Т.П., Малюта С.С.

Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев

Одним из моментов, обеспечивающих прогресс в области генетики конъюгативных плазмид, явилось использование донор-специфичных фагов в качестве селективного фактора при отборе мутантов по **tra**-оперону. В настоящей работе сообщаются некоторые теоретические предпосылки и первые экспериментальные результаты по использованию РНК-содержащего фага MS2 в качестве агента, индуцирующего мутации плазмиды F, интегрированной в хромосому.

Благодаря своей популярности как модели в исследованиях тонких механизмов трансляции, РНК-содержащие фаги представляют собою сейчас один из наиболее полно изученных биологических объектов. В то же время интереснейший момент их биологии - эволюционная и функциональная связь с F-фактором чувствительной клетки остается областью практически неизученной. Только один аспект этого вопроса - кодирование F-фактором половых фимбрий, обеспечивающих адсорбцию донор-специфичных фагов и проникновение их нуклеиновых кислот в клетку, представляется достаточно понятным. Второй аспект - возможное влияние РНК-содержащих фагов на плазмиду F в процессе инфекции чувствительной клетки - является предметом случайных размышлений /Хэйс, 1965/ или единичных экспериментальных работ отдельных исследователей /Widmer, Zebec, 1974; Zgaga, 1978/. О возможности взаимодействия РНК-содержащих фагов с F-фактором косвенно свидетельствует настораживающе легкое приобретение устойчивости к этим фагам клетками зараженной фагочувствительной популяции в условиях, препятствующих быстрому клеточному делению. К сожалению, вопрос лизогении у РНК-содержащих фагов трудно разрешим классическими тестами: особенности инфекционного цикла и наличие у РНК-содержащих фагов состояния носительства затрудняет интерпретацию опытов,

где наблюдалась секреция фага зараженной бактериальной культурой; с другой стороны, спонтанные мутации в F-факторе способны привести клетку в состояние устойчивости к донор-специфичным фагам, что ограничивает возможности теста на иммунность, обусловленную лизогенией. Поэтому в настоящее время вопрос нелитического взаимодействия РНК-содержащего фага с клеткой уместно сместить с проблемами лизогении к проблеме индукции фагоустойчивости в потомстве клетки, перенесшей заражение соответствующим фагом. Поскольку устойчивость к донор-специфичным фагам развивается на уровне плазмиды F /элиминация или мутация/, то экспериментальная система суживается к индукции мутаций в области F-плазмиды в процессе фаговой инфекции. Что касается общепринятого представления о селекции предсуществующих F⁻-форм, как основной причине накопления фагоустойчивых клеток в случае РНК-содержащих фагов, то экспериментальные доказательства в его пользу, по сути, отсутствуют. Более того, среди Hfr-клеток спонтанное образование F⁻-вариантов в результате потери F-фактора происходит слишком редко, чтобы обеспечить быстрое распространение фагоустойчивой популяции селекционным механизмом. В предшествующей работе /Перерва, 1977/ показано, что примерно 1,3% потомков инфицированной бактерии *E. coli* AB 259 Hfr3000 приобретают MS2-устойчивость, не связанную с селекцией предсуществующих F⁻-клеток. Изучение свойств таких мутантов и закономерностей их появления могло бы обеспечить дополнительный подход к изучению F- и F-подобных факторов. В настоящей работе мы подтверждаем это положение, описывая MS2-индуцированную MS2-устойчивую культуру и три производных ее варианта, у которых усугубление первичной мутации в области F плазмиды и сохранение фагоустойчивости сопровождается стойко наследуемыми изменениями мембран и оболочек и нарушением роста и деления, что отчетливо сказывается на морфологии колоний.

Первичноустойчивая культура представлена клетками, у которых, по данным биологического тестирования, почти полностью потеряна адсорбирующая активность. Электронномикроскопически на клетках обнаруживаются половые нити с адсорбиро-

ванными на них фаговыми частицами. Возможно, что наблюдаемая адсорбция имеет обратимый характер и блок инфицирования обусловлен отсутствием проникновения фаговой РНК в клетку. Наличие половых фимбрий у устойчивых клеток свидетельствует о сохранении ими F-фактора, а функциональная недостаточность фимбрий - о появлении в плазмиде F мутационного изменения. На плотной питательной среде клетки формируют колонии, не отличающиеся от колоний дикого типа.

Производные варианты /отобранны по морфологии колоний/

1. Ползуче-расплывающийся тип. Колонии имеют уплотненный центр и прозрачные изрезанные края. При длительном хранении чашечных посевов колонии сильно разрастаются, края их приобретают причудливую ветвистую форму, часть клеток врастает в агар. Структура колоний зернистая, что объясняется гибелью части клеток. Электронномикроскопически колонии состоят из смеси живых и наполненных комковатым содержимым погибших клеток. При этом часть погибших клеток представлена неразделившимися изогнутыми филаментозными формами. В отличие от первичноустойчивых клетки этого типа уже не имеют пилей и несут на своей поверхности только жгутики, т.е. нарушение роста и деления, а также изменение свойств мембран /ползучий рост/ и оболочек /изогнутые формы/ связаны у этого типа с событиями в области F плазмиды.

2. Лизирующий тип. На сплошном газоне зернистых колоний с ползучим ростом лизирующие клетки растут с образованием зон лизиса. На газоне исходных клеток *E.coli* Hfr3000 эти же клетки растут как отдельные колонии, но без зоны лизиса. На электронномикроскопических фотографиях лизирующие клетки не имеют ни жгутиков, ни F-пилей и содержат характерные структурированные образования, по количеству соответствующие числу нуклеоидов в клетке *E. coli*. Лизирующие клетки стойко сохраняют свои признаки за исключением одного - у некоторых клеток наблюдается восстановление жгутиков и часть колоний начинает давать ответвления ползучего роста. Зоны лизиса вокруг колоний обусловлены выделением не фага, а нестойкой при хранении неидентифицированной РНК, способной давать на чувствительном газоне мелкие прозрачные негативные колонии.

Скорость размножения клеток лизирующего типа превышает скорость размножения клеток исходного дикого типа в 5 раз. Электронномикроскопически наличие погибших изогнутых форм в препарате не наблюдается.

3. Слизистый тип. Колонии крупные, слизистые, выпуклые, через несколько суток уплощаются, приобретают перламутровый блеск и иногда лизируют.

Ревертабельность. Ни одна из мутантных форм не ревертирует к исходному морфологическому типу гладких колоний.

Контроль. В контрольных посевах необработанной флорой культуры описанные мутантные типы не обнаружены среди 5000 колоний.

Закономерности выщепления производных вариантов

1. Зернистые колонии с ползучим ростом выщепляются из первичноустойчивых клеток через выпячивания зернистого роста на колониях и ряд промежуточных форм /в основном мелкие круглые зернистые колонии/, высеваемых из этих выпячиваний. Частота выщепления мутантов составляет 13,4% от мелких и 0,07% от общего числа зернистых колоний /мелких и крупных/.

2. Колонии лизирующего типа выщепляются из зернистых колоний с ползучим ростом с частотой точечных мутаций $1,2 \cdot 10^{-7}$ - $8,5 \cdot 10^{-8}$ /, что может быть прослежено при высевах большого количества клеток предшествующего типа на чашку двуслойным методом.

3. Клетки, образующие слизистые колонии, выщепляются непосредственно при формировании колоний первичноустойчивого типа с образованием слегка выпуклых уплотненных блестящих секторов или петлеобразных структур с частотой 0,3%.

Обсуждаются отличия между MS2-селектированными и MS2-индуцированными мутантами в области F-фактора, некоторые особенности метаболизма последних, а также возможное участие в формировании фенотипа описанных MS2-индуцированных мутантов **origin** клеточной репликации, связанного с мембраной.

ПРОБЛЕМЫ ЭВОЛЮЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЛАЗМИД

Пехов А.П.

Университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва

К настоящему времени плазмиды идентифицированы в бактериях более 50 видов, принадлежащих к разным родам и семействам. Имея одинаковую химическую природу, они тем не менее, различаются между собой по физико-химической и генетической организации, а также по функциям, придаваемым ими бактериям. С учетом этих различий плазмиды представляют собой репликоны трех типов - факторы переноса, плазмидные коинтеграты и неконъюгативные генетические детерминанты тех или иных свойств. Факторы переноса, классическим примером которых является плаزمида F, представляют собой "чистые" половые факторы, обладающие лишь генами переноса и репликации. Плазмидные коинтеграты, примером которых являются R-плазмиды, составлены фактором переноса и теми или иными детерминантами свойств. Неконъюгативные генетические детерминанты, известные в основном по неконъюгативным детерминантам *r* /например, *SuSm* / и *Col*, лишены фактора переноса и обладают лишь генами репликации.

Если существование плазмид в разных структурно-функциональных формах является результатом их эволюции, то тогда один из наиболее эффективных подходов к выяснению их происхождения должен заключаться в том, чтобы рассматривать эволюцию факторов переноса и эволюцию генетических детерминантов контролируемых ими свойств отдельно.

Существование в выделяемых из природы бактериях разных факторов переноса показано в ряде лабораторий, включая нашу. Они идентифицированы в бактериях видов, принадлежащих к родам *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio* и другим. Как недавно предположено /Cohen, 1976; Cohen et al., 1978/, разные этапы эволюции факторов переноса, вероятно, заключались в сборке из дезоксирибонуклеотидов последовательности,

способной выполнять роль сайта инициации репликации, и в прибавлении к ней генов, определяющих остальные функции, необходимые для автономной репликации ДНК. Более поздние этапы были связаны со сцеплением первичных неконъюгативных репликонов с генами конъюгативности /переноса/ и развитием их в первичные факторы переноса. В рамках этой гипотезы и с учетом некоторых сходств между факторами переноса и фагами предполагается также, что эти структуры имеют общее происхождение. Сопоставляя сходства и различия между факторами переноса и фагами, мы склонны предположить далее, что после сборки ранних репликонов, вероятно, имела место дивергенция их свойств, давшая начало двум эволюционным ветвям в развитии ранних репликонов. Эволюционирование одной из этих ветвей привело к первичным факторам переноса, тогда как эволюционирование другой - к фагам. После возникновения первичных факторов переноса их развитие шло по линии обогащения дополнительными генами, вносящими разнообразие в характер их систем переноса. Это привело к формированию архитиповых F-, I-, H- и R-подобных факторов переноса, различающихся между собой по системам переноса. Последним этапом в эволюции факторов переноса со сходными системами переноса было, вероятно, формирование различий между ними по совместимости. Например, данные, полученные в нашей лаборатории, свидетельствуют, что в случае F-подобных факторов переноса количество групп несовместимости является большим, чем это можно было предполагать. Несовместимость является результатом эволюционирования архитиповых факторов переноса, а известные данные о частичной несовместимости между отдельными факторами переноса свидетельствуют о том, что их эволюция продолжается и в настоящее время. Установление в нашей лаборатории существования в бактериях одновременно двух разных факторов переноса выдвигает вопрос о происхождении таких комплексов.

Плазмидные коинтеграаты представляют собой наиболее распространенную форму существования плазмид. Некоторые обоснования к обсуждению эволюции плазмидных коинтеграатов в настоящее время имеются применительно к R-плазмидным коинтеграатам. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что перво-

начально в бактериях возникли факторы переноса R, а затем детерминанты r. Эволюционируя независимо, они вступали в рекомбинацию. Следовательно, коинтеграция является заключительным этапом в эволюции R-коинтеграторов /конъюгативных R-плазмид/. Происхождение R-факторов переноса является, вероятно, таким же, как и происхождение других факторов переноса. Что касается r-детерминантов, то для их происхождения предположено в основном три гипотезы. В соответствии с одной гипотезой предполагается, что r-детерминанты происходят из экстрахромосомной ДНК, которая в бактериях многих видов обычно содержится в форме независимо реплицирующихся автономных репликонов /Clowes, 1972; Mitsubishi, 1977/. По другой гипотезе предполагается, что r-детерминанты представляют собой хромосомные гены, ставшие в результате мутаций детерминировать лекарственную резистентность бактерий, а затем включившиеся в фактор переноса R на основе механизма "gene pick-up" /Watanabe, 1971/. Этот механизм формирования R-плазмид аналогизируется с механизмом формирования плазмид F'. Наконец, по третьей гипотезе предполагается, что r-детерминанты произошли от хромосомных генов, детерминирующих синтез антибиотико-модифицирующих ферментов в микроорганизмах, являющихся продуцентами антибиотиков /Walker, Walker, 1970; Davies et al., 1977/. "Путешествуя" в другие бактерии, эти гены становились в них r-детерминантами. Каждая из этих гипотез имеет как аргументацию, так и контраргументацию. Между тем, в последнее время при обсуждении структурной эволюции R-плазмид все большее внимание уделяют транспозонам. Установлено, что роль транспозонов важна в "обрастании" R-плазмидных коинтеграторов r-детерминантами. Общие идеи относительно происхождения R-плазмидных коинтеграторов, вероятно, применимы и к другим плазмидным коинтегратам. По аналогии с R-плазмидами можно предполагать, что независимое происхождение имеют также факторы переноса и детерминанты соответствующих свойств в случае плазмид Col, Ent и Hly. Однако детерминанты колициногенности, энтеротоксигенности и гемолизующей способности по своей генетической организации и природе контролируемых продуктов отличаются от

r-детерминантов. Следовательно, их происхождение является другим. Возможно, они произошли от хромосомных генов, но такое допущение вопреки доступности для экспериментальной проверки все же не имеет обоснований.

Как сейчас установлено, неконъюгативные генетические детерминанты обнаруживаются с довольно высокой частотой. Их происхождение является, вероятно, таким же, как и происхождение аналогичных детерминантов, обнаруживаемых в плазмидных коинтегратах. Например, происхождение широко известных неконъюгативных детерминантов **SuSm**, а также обнаруженных в нашей лаборатории неконъюгативных детерминантов **Tc**, **Ap** и других, может обсуждаться таким же образом, как и происхождение **r**-детерминантов **SuSm** и **Tc** или **Ap** в конъюгативных плазидах **R (SuSm)R(Tc)** или **R(Ap)**. Совершенно неожиданной является гипотеза, в соответствии с которой неконъюгативные плазмиды происходят от фагов /*Mitsubashi*, 1977/. Эта гипотеза противоречит имеющимся представлениям о связях между плазидами и фагами и не доступна для экспериментальной проверки.

Исследование эволюционной проблематики плазмид, по существу, лишь только начинается, а рассмотренные здесь подходы к объяснению эволюции разных плазмид отражают направления поисков в этой области. Между тем, знания об эволюции плазмид имеют фундаментальное значение. Они важны не только для понимания эволюции генов, но и для решения ряда прикладных вопросов, включая организацию плазмидного мониторинга.

ИЗУЧЕНИЕ ПЛАЗМИД КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК

Руднева С.Н., Столярова Л.Г., Буянова Н.И.,
Ершов А.А., Пастернак Н.А.

Научно-исследовательская лаборатория экспериментальной
иммунобиологии АМН СССР, Москва

У 102 штаммов энтеропатогенных кишечных палочек, выделенных от больных носителей и из объектов окружающей среды в

1977-1978 гг., изучали частоту распространения различных плазмид /R, *Hiy*, CoI, *Ent* / и их генетические свойства.

Методом серийных разведений на плотной питательной среде определена чувствительность штаммов к 8 антибактериальным препаратам. Все штаммы резистентны к сульфаниламидам. 59% штаммов оказались чувствительными ко всем исследованным антибиотикам, остальные обладали устойчивостью к ним, при этом 24% штаммов - множественной устойчивостью. 58% антибиотикоустойчивых эшерихий несли конъюгативные R-плазмиды. У выявленных R-плазмид были изучены ri^+/ri^- - свойства и принадлежность к группам совместимости с эталонными плазмидами групп FI - FVI.

Все штаммы изучены на способность продуцировать гемолизины и колицины. Найдено, что 9 штаммов способны продуцировать гемолизины, 32 штамма - колицины. У выявленных штаммов изучали характер детерминирования этих свойств /конъюгативность, элиминация/. Из 20 штаммов, изученных на токсигенность, 21 обладал четко выраженными токсигенными свойствами. У части штаммов способность к продукции токсинов передавалась при конъюгации в клетки-реципиенты *E. coli* KI2 с низкой частотой.

В реакции нарастания титров /PNT/ донорспецифического фага F - группы определен F - подобный характер плазмид у I6 из I02 исследованных штаммов.

30% штаммов имели полиплазмидный характер. Из них I8 штаммов несли плазмиды, контролирующие два вида активности, 9 штаммов - 3 и 3 штамма - 4 вида активности /колициногенную, гемолитическую, энтеротоксигенную и резистентность к антибиотикам/.

Частота встречаемости и характер обнаруженных плазмид сопоставлены с сероварами исследованным штаммов.

К ВОПРОСУ ОБ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСФОРМАЦИИ И ТРАНСФЕКЦИИ
РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ *E. coli* ИЗОЛИРОВАННЫМИ ДНК И СПОСОБАХ
УВЕЛИЧЕНИЯ ТРАНСФОРМАЕЛЬНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ШТАММОВ

Рудченко О.Н., Левина Н.Б., Никитин А.Н.
Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

Изучение закономерностей проявления биологической активности изолированных нуклеиновых кислот в клетках различных реципиентов приобретает все большее практическое и теоретическое значение. Практика показывает, что процесс формирования у клеток восприимчивости к нуклеиновым кислотам в значительной степени зависит от индивидуальных особенностей штамма-реципиента.

Проведенное в настоящей работе сравнительное изучение трансформации 10 различных штаммов *E. coli* показало, что уровень трансформации некоторых штаммов можно увеличить различными способами. Из испытанных способов наиболее эффективными оказались: обработка клеток $BaCl_2$ вместо $CaCl_2$, выращивание клеток в 0,5М сахарозе, воздействие на клетки лизоцимом, замораживание - оттаивание клеток в момент контакта их с ДНК. Хороший эффект в ряде случаев оказывают различные сочетания указанных факторов. Реакция разных штаммов на каждый из факторов весьма индивидуальна.

Изучение поведения 8 различных плазмид в разных реципиентах показало, что высокая восприимчивость клеток к изолированным ДНК не служит гарантией эффективной трансформации любой плазмидной ДНК. Выявлена высокая избирательность некоторых реципиентов по отношению к определенным ДНК.

Выявлены штаммы, избирательно поглощающие фаговую ДНК, но мало эффективные в системе трансформации.

УМЕРЕННЫЕ ФАГИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ МУТАНОВ
BACILLUS THURINGIENSIS VAR. GALLERIAE

Рязанкина О.И., Кренделева Л.Я., Бурцева Л.И.
Специальное конструкторско-техническое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск

Все штаммы *Bac. thuringiensis var. galleriae*, которые используются в производстве энтомопатогенного препарата "Энтобактерин", лизогенны.

Изучение умеренных фагов этих культур поможет в решении вопроса о причинах возникновения фаголизиса в производстве.

Изучались умеренные фаги 5 морфологических мутантов *Bac. thuringiensis var. galleriae*, выделенные спонтанно и индуцированные митомизином С.

Исследовали морфологию негативных колоний, спектр литического действия выделенных фагов на штаммах 18 разновидностей *Bac. thuringiensis var. gal.* и электронную микроскопию.

Оказалось, что по всем перечисленным признакам умеренные фаги из штаммов четырех морфологических мутантов B_2 , B_3 , P_I и P_2 идентичны. Фаги лизировали культуры *Bac. thuringiensis var. satto*, *var. galleriae*, определенные чувствительные штаммы, *var. morrisoni*, *var. tolworthi*. Образовывали негативные колонии на чувствительных культурах диаметром 2-3 мм с прозрачной серединой и с мутными размытыми краями.

На электронномикроскопических фотографиях фаги имели головку гексагональной формы и длинный несокращающийся отросток с периодической исчерченностью.

Все препараты умеренного фага из морфологического варианта B_I лизировали культуры *Bac. thuringiensis var. aizawa*. Образовывали точечные негативные колонии. На электронномикроскопических фотографиях встречались 2 типа фага. Один из них имел многогранную головку удлинённой формы, к которой прикреплена базальная пластинка с шиповидными выростами. От головки через базальную пластинку отходит отросток, имеющий вид полый трубки. Головка другого фага представляла собой

изометрический многогранник. Отросток способен к сокращению. На конце отростка можно видеть утолщение, представляющее собой, видимо, базальную пластинку.

ХАРАКТЕРИСТИКА КОНЬЮГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ МУТАНТОВ *ESCHERICHIA COLI* K12

Рязанова Л.А., Чемлева Н.Г.

2-ой Московский государственный медицинский
институт им. Н.И. Пирогова, Москва

Эффективность осуществления известных способов генетического обмена у микроорганизмов во многом зависит от реципиентных клеток, поэтому изучение роли реципиентных бактерий в процессах передачи генетического материала привлекает пристальное внимание исследователей. В частности, при конъюгации работы такого рода осуществляются по трем направлениям: 1/ выяснение участия реципиентных клеток в той или иной стадии конъюгации /Curtiss, 1969; Brinton, 1971; Бреслер и др., 1973/; 2/ выявление факторов, влияющих на эффективность образования рекомбинантов и трансконъюгантов /Curtiss et al., 1968; Ou, Anderson, 1972 и др./; 3/ получение мутантов, отличающихся по конъюгационной способности /Monner et al., 1971; Минина и др., 1973; Reiner, 1974; Skurray et al., 1974; Manning, Reeves, 1975; Havelkes et al., 1976; 1977/.

В данной работе нами изучена реципиентная активность при конъюгации морфологических мутантов полиауксотрофного штамма *E. coli* K12 PA 602I, которые получены с помощью нитрозометилмочевины и отличаются от исходных палочковидных клеток по своей морфологии: одни из них имеют правильную сферическую форму и образуют слизистые колонии на плотной среде /мутанты PA14 и PA16 /, другие - эллипсоидной /штамм PA11/ или округлой /штамм PA17 / формы растут мелкими до 1 мм в диаметре колониями /Чемлева, 1977/.

О реципиентной активности этих морфологических мутантов

судили по частоте выхода рекомбинантов и трансконъюгантов в конъюгационных скрещиваниях с донорными штаммами типа Hfr, F' и R⁺. В качестве R⁺ - доноров использовали штаммы E.coli K12 с плазмидами RAI, RPI, RI-I6, RI-I9, R64-II, RI24, R446^B, R538-I и R724. Статистически значимую разницу в частоте образования трансконъюгантов определяли с помощью t-критерия.

Результаты проведенных скрещиваний показали, что все изученные морфологические мутанты отличаются от исходного родительского штамма по реципиентной способности. Так, мутантные производные PAL4 и PAL6 ведут себя аналогичным образом в качестве реципиентов и характеризуются статистически значимым снижением частоты образования трансконъюгантов с 9 из 11 проверенных донорных штаммов. Такое сходство в уменьшении эффективности плазмидной передачи позволяет объединить эти мутанты в одну группу. Два других мутанта, PAL1 и PAL7, помимо этого, воспринимают с обычной частотой плазмиду RPI и не отличаются от исходного реципиента по эффективности образования рекомбинантов в скрещиваниях с донором Hfr H. Вместе с тем, у этих двух мутантов резко угнетен выход F'-трансконъюгантов. Между собой эти мутанты отличаются тем, что штамм PAL1 сохраняет обычную, свойственную исходному реципиенту PA 602I, реципиентную способность относительно плазмиды R64-II, а мутант PAL7 - относительно плазмиды RI-I9. При сравнении эффективности наследования морфологическими мутантами разных плазмид, представителей одной группы несовместимости /группа FII/, установлено, что все мутанты наследуют плазмиду R538-I со сниженной частотой, а плазмиду RI-I9 - с обычной частотой. Интересно отметить, что другой дериват плазмиды RI, RI-I6 нормально наследует только штамм PAL7.

Таким образом, у всех морфологических мутантов штамма E. coli K12 PA 602I изменилась реципиентная способность при конъюгации, причем снижение реципиентной активности более выражено у морфологических мутантов PAL4 и PAL6, чем у мутантов PAL1 и PAL7.

КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК С ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКИМИ ЛИПКИМИ КОНЦАМИ

* Саарма М.Ю., Рээман К.Ю., Талпсепп Т.Э., Тоотс И.Э.

*Институт физики АН ЭССР, Тарту;
Тартуский госуниверситет, Тарту

Изучение тонкой структуры генома является предпосылкой для понимания процессов регуляции активности генов. При анализе структуры генов существенными этапами являются следующие:

- 1/ клонирование ДНК в плазмиду или в фág;
- 2/ рестрикционный анализ;
- 3/ секвенирование.

Все эти процедуры являются довольно трудоемкими, хотя для каждого этапа и выработаны приемы, облегчающие работу. Предполагаемая схема проведения эксперимента существенно облегчает клонирование, рестрикционный анализ и секвенирование фрагментов геномной ДНК. Особое применение такая схема может найти в работе с генами млекопитающих, проводимых в условиях ф-3.

Подход заключается в следующем: ДНК и плазида /например pBR322/ гидролизуются двумя рестриктазами, дающими липкие концы. Желательно, чтобы сайт одной рестриктазы находился бы в гене устойчивости антибиотика.

Для плазмиды pBR322 или pBR325 можно использовать пары **EcoR1 - BamH1**; **BamH1 - HindIII**; **HindIII - Sal1**; **Sal1 - Pst1** и т.д., а исследуемую ДНК подвергать неполному гидролизу рестриктазами. Для клонирования рДНК из печени крысы мы использовали пару **EcoR1 - BamH1**. Как показали результаты, при трансформации **EcoR1 - BamH1** гидролизованных плазмид pBR322 из 0,1 мг плазмидной ДНК образуется около 10-15 трансформантов, а при трансформации **EcoR1** или **BamH1** гидролизованных плазмид по 10^5 трансформантов. Обстоятельство, что среди трансформантов при клонировании **EcoR1** и **BamH1** фрагментов в плазмиду pBR322 95% составляют рекомбинанты,

существенно облегчает отбор клонов. При клонировании **EcoRI** или **BamHI** фрагментов среди трансформантов подавляющее число колоний содержат рециклизованную плазмиду. Гидролиз ДНК двумя рестриктазами приводит к образованию довольно-таки большого числа фрагментов с гомологическими липкими концами, не встречающимися в плазмиде. Это является ограничением данного подхода.

Для обогащения рекомбинантов среди трансформантов существуют и другие методы, как фосфатазный гидролиз и обработка циклосерином, дающие выигрыш при клонировании, но не при рестрикционном анализе и секвенировании. В основном для рестрикционного анализа используются трудоемкий и требующий много времени ступенчатый блочный анализ.

Несколько лет тому назад **Smith** и **Birnsteil** предложили метод частичного гидролиза фрагментов ДНК, меченных только по одному концу. Преимущество метода заключается в скорости его проведения, недостаток - в трудностях при мечении лишь одного конца ДНК. Процесс намного облегчается путем использования рекомбинантной ДНК со вставкой с гетерологичными липкими концами. В начале рекомбинантная плазмидная ДНК гидролизуется одной рестриктазой /напр. **EcoRI**/ и образующиеся концы метят по 5'-концу киназой или ДНК-полимеразой, далее меченный продукт гидролизуется второй рестриктазой /например **BamHI**/ . Таким образом получают вставку и плазмиду, меченные по одному концу.

Для анализа первичной структуры ДНК пользуются в основном химическим методом Гильберта и Максама и энзиматическим методом Сангера. Оба эти метода требуют разделения комплементарных цепей, а метод Сангера требует и затравки.

При использовании клонирования с двумя рестриктазами все оказывается намного проще. Так как можно метить один или другой конец вставки отдельно, то для секвенирования методом Гильберта и Максама нет необходимости вообще в разделении цепей. Очевидна возможность применения вышеприведенной схемы и в отношении дидезокси-терминаторметода Сангера.

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ И МЕМБРАНОТРОПНЫХ АГЕНТОВ НА ТРАНСФОРМАЦИЮ *E.coli* ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Сабельников А.Г., Домарадский И.В.

Всесоюзный научно-исследовательский институт

биосинтеза белковых веществ, Москва

К настоящему времени накопилось значительное число данных о чувствительности процессов генетической трансформации и трансфекции истинно трансформабильных бактерий к различным разобщителям и метаболитическим ингибиторам /Laks, 1977/. На основе этого в последнее время выдвинута гипотеза о прямом участии протондвижущей силы в процессе проникновения экзогенной ДНК внутрь бактериальных клеток при генетической трансформации, трансфекции, конъюгации и фаговой инфекции /Гринюс, 1976/. Однако в отношении трансфекции и трансформации грамотрицательных бактерий полученные данные не позволяют сделать окончательных выводов, хотя результаты, полученные с замороженно-оттаянными /Дитяткин, 1979/ и обработанными Ca^{2+} клетками /Taketo, 1974; Сабельников и др., 1978/ свидетельствуют о том, что эти процессы, по-видимому, резистентны к весьма широкому спектру различных ингибиторов.

В настоящей работе предпринята попытка широкого исследования этого вопроса на модели трансформации бактерий *E.coli*, обработанных катионами Са плазмидной ДНК. В исследовании использовали меченные ^{14}C и немеченные ДНК плазмиды PAIR2. В качестве метаболитических ингибиторов использовали фторид натрия и арсенат, нигерицин, карбонил-цианид- α -хлорфенилгидразон /КХФ/, валиномицин, пентахлорфенол, N,N^1 -дидецилогексилкарбодиимид /ДДКД/, хлористый аммоний и липидрастворимые ионы - тетрафенилфосфоний /ТФФ $^{+}$ / и тетрафенилборон /ТФВ $^{-}$ /.

Согласно полученным данным, эффективность трансформации значительно /около порядка/ снижалась при обработке клеток нигерицином, ТФВ $^{-}$, ДДКД и арсенатом /если с последним клетки выдерживали не менее часа/. Валиномицин, пентахлорфенол, ТФФ $^{+}$ и КХФ либо вообще не оказывали эффекта, либо эффект был сла-

бо выражен. Все агенты, за исключением ТФФ⁺ и ТФВ⁻, в использованных концентрациях значительно влияли на жизнеспособность клеток. Эксперименты с ¹⁴C-ДНК не выявили выраженных различий в способности клеток, обработанных различными агентами, связывать экзогенную ДНК. В экспериментах с "разделением" клеток до сферопластов контрольные клетки в состоянии сферопластов содержали примерно такое же количество радиоактивности, что и клетки, обработанные ТФВ⁻, нигерицином и ДДКД.

Полученные данные обсуждаются с точки зрения хемиосмотической концепции "транспорта" ДНК внутрь клеток.

На основании полученных данных делается вывод о том, что 1/ протондвижущая сила не является движущей при проникновении экзогенной ДНК внутрь обработанных Са²⁺ клеток *E.coli*; 2/ влияние протонифоров - разобщителей окислительного фосфорилирования на процесс проникновения ДНК внутрь клеток не является прямым /коллапсирование $\Delta\mu_H$ /, а опосредовано конформационными изменениями структуры мембран при их деэнергизации.

ЗАВИСИМОСТЬ УЧАСТИЯ ПЛАЗМИДЫ pKM101 В РЕПАРАЦИИ
УФ-ПОВРЕЖДЕНИЙ И МУТАГЕНЕЗЕ *E.coli* ОТ "ЦИС"
ИЛИ "ТРАНС"-ПОЛОЖЕНИЯ ПЛАЗМИДЫ

Скавронская А.Г., Алешкин Г.И., Бруханский Г.В.
Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Плазмида pKM101 и ряд подобных ей плазмид повышают резистентность бактериальных клеток к УФ-свету, УФ-индуцированный мутагенез и способность к другим функциям клетки, относимым к действию "SOS" системы репарации. Механизм действия плазмид остается неизвестным. Исходя из совокупности свойств указанных плазмид, мы предположили, что повышение репаративных функций клетки за счет плазмид может быть объяснено интеграцией плазмид в хромосому, вследствие остановки

повреждающими агентами репликации хромосомы, с последующей репликацией хромосомы репликатором плазмиды. С целью проверки этого предположения нами сконструированы штаммы *E. coli*, несущие плазмиду pKM101, как интегрированную в хромосому, так и в автономном состоянии /в "цис" или в "транс" положении/. Штаммы сконструированы на основе *dnaA* мутанта *E. coli*, неспособного к инициации репликации хромосомы при повышенной температуре. Исследования, проведенные на *dnaA* штамме показали, что наличие мутации *dnaA* приводит: 1/ к снижению УФ-резистентности, 2/ отсутствию УФ-индуцированного мутагенеза, 3/ повышению частоты спонтанной индукции бактериофага лямбда. Эти данные свидетельствуют о возможности участия белков репликационного комплекса в указанных процессах. Нам установлено, что плазмиды pKM101, B245, B124 способны к обратимой интеграции в хромосому *dnaA* штамма *E. coli* с высокой частотой $/10^{-2} - 10^{-4}/$. Наличие этих плазмид в *dnaA* штамме в "транс" положении приводит к повышению УФ-резистентности, восстановлению УФ-индуцированного мутагенеза. Интеграция плазмиды pKM101 в хромосому приводит к ликвидации указанных эффектов, одновременно повышая на несколько порядков частоту спонтанной индукции бактериофага лямбда. Вырезание плазмиды из хромосомы восстанавливает плазмидный эффект: повышение УФ-резистентности, способность к УФ-индуцированному мутагенезу. Частота спонтанной индукции фага снижается до исходной. Установлено, что плаزمида pKM101 в "транс" положении увеличивает скорость восстановления одонитевых разрывов ДНК при 30°C у *E. coli*. Приводимые данные обсуждаются с точки зрения "интегративной" гипотезы участия плазмид в процессах репарации ДНК от УФ-повреждений и УФ-мутагенезе.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ И МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ F'-ПЛАЗМИД У *ESCHERICHIA COLI* K12

Смирнов Г.Б., Ильина Т.С., Горехов В.Н.

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Процесс образования F' плазмид использован нами для изучения клеточных рекомбинационных процессов. Установлено, что определенная роль в образовании F-прим плазмид принадлежит как донорской, так и реципиентной клетке. Рекомбинационные события, происходящие в Hfr-доноре и приводящие к образованию F'-плазмид, делятся на *recA*-зависимые и *recA*-независимые и оперируют на различных участках генетического материала. Оба типа рекомбинационных событий частично зависят от гена *seg*. Установлено также влияние на характер F' образования донорского гена *nalA* и выделенной нами мутации *fpf5*. Как *recA*⁻, так и *nalA*⁻ мутации донора ограничивают число возможных областей, вовлекаемых в рекомбинацию при образовании плазмид F'. Мутация *fpf5* снижает валовый выход F' плазмид и существенно изменяет долю вклада различных генетических областей в процессе рекомбинации при образовании F-прим плазмид.

Структура образующихся плазмид зависит и от генотипа реципиента. Установлено, что *nalA*⁻-мутация реципиента уменьшает общую частоту образования плазмид и долю конъюгативных плазмид, ограничивает количество областей генома, вовлекающихся в рекомбинацию при образовании F-прим плазмид и увеличивает частоту этого рода рекомбинации на одном из участков генома.

Помимо перечисленных генетических детерминант установлено наличие других областей на хромосоме *Escherichia coli*, оказывающих влияние на образование плазмид F'.

ВЛИЯНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРАНСПОЗОНА *TnI* НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНТЕГРАЦИИ R-ФАКТОРА RP4 С ХРОМОСОМОЙ *E. coli*

Степаншин Ю.Г., Амосенко Ф.А., Данилевич В.Н.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
антибиотиков, Москва

Механизмы интеграции репликонов до сих пор остаются малоизученными. Объединение репликонов, имеющих протяженные области гомологии, осуществляется путем *recA*-зависимой ассоциативной рекомбинации, происходящей в участках гомологии. Репликоны, не обладающие протяженными областями гомологии, интегрируют посредством различных механизмов. В частности, объединение репликонов может быть обеспечено одним из классов встраивающихся последовательностей - транспозонами - генетическими элементами, несущими детерминанты устойчивости к антибиотикам.

Ранее нами был изучен механизм интеграции плазмиды RP4 с хромосомой клетки *E. coli* K12, опосредованной транспозоном устойчивости к ампициллину *TnI*, входящим в состав этого R-фактора. Для этого использовали термочувствительный по поддержанию мутант *rec1*, полученный на основе плазмиды RP4.

Встраивание плазмиды в хромосому осуществляется в два этапа. На первом этапе происходит *recA*-независимая транслотация транспозона *TnI* в бактериальную хромосому. На втором этапе осуществляется *recA*-зависимая рекомбинация между транспозоном плазмиды и тем же транспозоном, встроенным в хромосому. Нечетное число кроссинговеров между двумя участками гомологии приводит к объединению двух репликонов.

В настоящей работе нами показано, что эффективность ассоциативной рекомбинации между плазмидой RP4 и хромосомой зависит от функциональной активности, по крайней мере, транспозона, входящего в состав R-фактора.

В экспериментах был использован температурочувствительный по поддержанию мутант RP1-6 *rep(ts12)*, производный фактора RPI, выделенный в лаборатории А.И. Степанова.

Этот мутантный фактор обеспечивает резистентность несущих его клеток к тетрациклину и канамицину при 31°C на уровне "дикого" RP4. Маркер устойчивости к ампициллину был намеренно поврежден перед получением **ts**-мутанта. Инактивация детерминанта устойчивости к ампициллину у мутанта **RP1-6 rep(ts12)**, вероятно, связана с точечной мутацией или небольшой делецией, которую не представляется возможным выявить с помощью гетеродуплексного анализа.

За счет **recA**-зависимого обмена аллелями между транспозоном **TnI**, встроенным в хромосому *E. coli*, и гомологичным фрагментом фактора **RP1-6 rep(ts12)** были выделены рекомбинантные плазмиды с восстановленным маркером устойчивости к ампициллину /**Ap**-производные **ts**-мутанта/. Генетический анализ выявил два типа рекомбинатов:

1/ **ts**-мутанты, у которых маркер **amp^r** способен транслоцироваться в хромосому бактерии, то есть несущие функционально-активный транспозон;

2/ **ts**-мутанты, у которых маркер **amp^r** не обладает способностью к транслокации, то есть несущие функционально неактивный транспозон.

Две плазмиды **pWD3** и **pWD1**, представляющие соответственно первый и второй типы рекомбинантных плазмид, были исследованы физико-химическими методами.

Электрофоретический анализ **Sma1** и **Pst1** рестриктов ДНК этих плазмид не выявил у них никаких изменений по сравнению с RP4. Никаких структурных изменений не было обнаружено и при электронномикроскопическом анализе гетеродуплексов ДНК рекомбинантных плазмид с ДНК RP4.

Вероятно, функциональная неактивность транспозона у плазмиды **pWD1** так же, как и у исходного **ts**-мутанта, является результатом повреждения структуры либо инвертированных повторов, либо структуры генов, контролирующих транслокацию этого транспозона.

С целью изучения эффективности интеграции фактора **RP1-6 rep(ts12)** и его производных с функционально-активным и неактивным транспозоном **TnI** нами были сконструированы **Rec⁺** и **RecA⁻** штаммы *E. coli* **K12**, несущие встроенный в хромосому

транспозон **TnI** и содержащие соответствующие плазмиды. Эффективность интеграции плазмид с хромосомой оценивали по частоте образования колоний клетками бактерий, несущих плазмиды, на средах, содержащих тетрациклин /канамицин/, при 43°C.

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что частота образования колоний клетками **Rec⁺** штаммов, несущими плазмиду **pWD3** на среде с антибиотиками при непермисивной температуре, значительно превышает /в 30-50 раз/ частоту образования колоний клетками тех же штаммов, несущих плазмиду **pWD1**. Отсюда следует, что эффективность интеграции плазмиды, несущий в своем составе функционально-активный транспозон более чем на порядок выше эффективности интеграции плазмиды с поврежденным /неактивным/ транспозоном.

Что же касается частоты образований колоний клетками **RecA⁻** штаммов, несущих плазмиды **pWD1** и **pWD3** при непермисивных условиях в присутствии антибиотиков, то она значительно ниже /на три порядка/ частоты образований колоний бактериями **Rec⁺** штаммов. Это подтверждает ранее полученные нами данные о том, что интеграция плазмид с хромосомой, опосредованная транспозоном, - процесс **recA**-зависимый.

Из полученных нами результатов следует, что способность транспозона **TnI** к транслокации, то есть его функциональная активность, играет важную роль в процессе интеграции репликонов плазмиды **RP4** в хромосому **E. coli**, опосредованной данным транспозоном. Мутации, приводящие к инаktivации транспозона, значительно снижает эффективность интеграции.

Существенное изменение частоты ассоциативной рекомбинации между двумя репликонами не связано с заметным изменением степени гомологии рекомбинирующих структур у транспозонов у плазмид **pWD1** и **pWD3**.

Одним из объяснений наблюдаемого явления может быть предположение о возможном участии ферментативной системы, обеспечивающей транслокацию транспозона **TnI**, на одном из этапов процесса интегративной **recA**-зависимой рекомбинации.

Обнаруженный эффект можно также объяснить, допустив существование в пределах транспозона **TnI** специфического сайта "горячей точки" - для **recA**-зависимой рекомбинации. По-

вредение этого сайта значительно снижает частоту ассоциативной рекомбинации.

ИЗУЧЕНИЕ ПЛАЗМИД У УРОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ

Таллмейстер Э.Т., Тюри М.Э., Тюри Э.И., Хейнару А.Л.
Тартуский государственный университет, Тарту

Подавляющее большинство / > 95% / уроинфекций вызывается грамотрицательными бактериями, вследствие чего изучение механизма антибиотикорезистентности этих бактерий является чрезвычайно актуальной проблемой. Использованием количественных методов определения микроорганизмов выделены из мочи больных 68 штаммов различных грамотрицательных возбудителей уроинфекций. Больше половины /36/ выделенных штаммов идентифицировали как *E. coli*, а остальные отнесены к родам *Proteus* (11), *Citrobacter* (10), *Klebsiella* (4), *Enterobacter* (3), *Hafnia* (1) и *Pseudomonas* (3). У всех штаммов определяли чувствительность к ампициллину, стрептомицину, хлорамфениколу, тетрациклину, канамицину, гентамицину, полимиксину М, рафампицину, а также к налидиксовой кислоте, бисептолу и мертиолату.

Мертиолат - органический препарат ртути, подавлял рост почти всех исследуемых штаммов в концентрации 1 мкг/мл среды и менее. Однако у 4 штаммов уровни резистентности к этому препарату были равны 15-20 мкг/мл. Большинство штаммов /59% / обладало резистентностью к трем и более препаратам одновременно: чаще всего к ампициллину, стрептомицину, хлорамфениколу. Примерно одна треть штаммов были устойчивы к бисептолу - фирменному препарату с содержанием триметроприма и сульфаметоксазола.

В результате опытов по конъюгационной передаче факторов резистентности, проведенных на 42 штаммах с использованием в качестве реципиентных бактерий *E. coli* K12 C600 *trc⁻leu⁻thi⁻str⁻nal⁺*, *E. coli* K12S *gen⁺* и *Ps. aeruginosa* PAO

2003 $\arg^{-}str^{+}rif^{r}$, были обнаружены трансмиссивные плазмиды у 19 штаммов, в том числе и у двух штаммов *Ps. aeruginosa*. При этом в одном случае передача R-плазмид осуществлялась от штамма *Ps. aeruginosa* и на реципиентный штамм *E. coli* K12. Это свидетельствует о том, что имели дело с типом плазмиды из группы несовместимости P-I. У другого штамма *Ps. aeruginosa*, продуцирующего пигмент типа меланинов, можно было констатировать элиминацию детерминантов резистентности к стрептомицину и канамицину. Кроме того, у этого же штамма была выделена плазмидная ДНК и определен ее молекулярный вес. У двух штаммов *E. coli* наблюдалась совместная передача R- и Col-плазмидов на реципиентный штамм *E. coli* K12, причем с детерминантом резистентности к бисептолу.

Итак, среди исследованных уропатогенных микробов часто обнаруживались полирезистентные грамотрицательные бактерии, среди которых в 45% случаев удалось выявить конъюгативные R-плазмиды.

ИССЛЕДОВАНИЯ R-ПЛАЗМИД, РЕЗИСТЕНТНОСТИ К СОЛЯМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ПСЕВДОМОНАД, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РЕЧНОЙ ВОДЫ И ИЗ ПОЧВЫ

Таллмейстер Э.Т., Хейнару А.Л.
Тартуский государственный университет

Из посевов различных материалов внешней среды на определенные среды обогащения можно выделить штаммы псевдомонад, несущие многообразные плазмиды. Нами приводятся данные об исследовании биологических свойств штаммов рода *Pseudomonas*, выделенных на обычной цитратной среде из проб воды реки Эмайги, взятых около г. Тарту. Всего изучено 78 штаммов, которые сравнивали с 12 штаммами псевдомонад, ранее изолированных из проб почвы и содержащими плазмиды биodeградации. У выделенных культур определяли оксидазную активность, разжижение желатины, окисление глюкозы, подвижность, выделение

пигментов при росте их на средах **King A** и **King B** и флюоресцирующие свойства пигментов под УФ-облучением при 254 нм. Были определены спектры резистентности штаммов к ампициллину, стрептомицину, хлорамфениколу, тетрациклину, канамицину, гентамицину, полимиксину М, рифампицину, а также устойчивость к налидиксовой кислоте, бисептолу, мертиолату и по отношению к CdCl_2 . Вместе с тем определяли метаболические процессы, связанные с расщеплением ряда органических соединений: камфоры, октана, нафталина, метатолуата, салицилата и гербицида 2,4 Д.

Выяснилось, что около половины исследуемых штаммов, выделенных из речной воды, оказались устойчивыми к ампициллину, стрептомицину и рифампицину, почти одна треть их — к тетрациклину и бисептолу и 10–12% штаммов — к канамицину и хлорамфениколу. Совсем не обнаружили штаммов, быстро растущих в присутствии камфоры, нафталина или метатолуата в качестве единственного источника углерода и энергии в составе питательной среды. Зато были обнаружены штаммы положительные к салицилату /21 штамм/, к октану /7/ и гербициду 2,4 Д /6/. Всего 29 штаммов /37%/, выделенных из воды, обладали активностью биodeградации, а среди них 8 являлись еще устойчивыми к мертиолату и 12 — к CdCl_2 . Можно предположить, что у исследуемых штаммов псевдомонад указанные биологические свойства детерминированы плазмидами биodeградации. Попытки конъюгационной передачи факторов резистентности, проведенные пока на пяти штаммах псевдомонад с использованием в качестве реципиентов *Ps. aeruginosa* PAO 2003 $\text{arg}^- \text{str}^r \text{rif}^r$ и *Ps. putida* Paw340 $\text{trp}^- \text{str}^r$, привели к обнаружению конъюгативных R-плазмид у двух из них.

Таким образом, около одной трети из штаммов псевдомонад, выделенных из проб речной воды без применения специальных сред обогащения, обладала свойствами, типичными для штаммов, несущих плазмиды биodeградации и R-плазмиды. То обстоятельство, что подавляющее большинство этих микробов были выделены из реки Эмайги ниже черты города Тарту, указывает на роль загрязнения воды соответствующими веществами при селекции таких вариантов микроорганизмов.

КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОВ РЕПЛИКАЦИИ ПЛАЗМИДЫ RP4

Урлапова С.В., Якубов Л.З., Степанов А.И.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Рекомбинантные молекулы ДНК, сконструированные с помощью методов генной инженерии, открывают широкие перспективы для генетического анализа бактериальных плазмид.

Использование двухрепликонной плазмиды **pAS8**, полученной объединением *in vitro* ДНК плазмиды **ColE1** и фактора лекарственной устойчивости **RP4** по сайтам расщепления рестриктазой **EcoR1**, а также "мутагенез", обусловленный внедрением транспозона **TnC** в плазмидную ДНК, способствовало выделению мутантов с поврежденными жизненно важными генами **RP4**-компонента.

Известно, что для репликации плазмиды **ColE1** необходима ДНК-полимераза I. В случае повреждения репликационного аппарата плазмиды **RP4** существование в клетках мутантных гибридных плазмид невозможно при блокировании **ColE1**-репликационной системы.

Нарушение генов репликации **RP4**-репликона тестировали по утрате способности **pAS8-1::TnC**-производных стабильно наследоваться в штамме **E. coli K855** с температурочувствительной ДНК-полимеразой I при перmissive и nonpermissive температуре. Анализ поведения 1500 конъюгативных транспозированных плазмид (**pAS8-1::TnC**) в штамме **Pol^{ts}** позволил обнаружить семь мутантов с поврежденными генами репликации **RP4**-компонента. Выделенные мутанты представляют собой относительно простую модельную систему для анализа генов /участков/ плазмиды **RP4**, определяющих ее репликацию и несовместимость.

На основании результатов гетеродуплексного и рестрикционного анализов гены репликации **rep1** и **rep2** картированы в районах II,8 и I7,2 килобаз /кб/ карты **RP4**, соответственно, а ген **rep3** локализован на участке II,8-I7,2 кб.

По данным комплементационного анализа выделенных мутантов с плазмидами **RP1-6 rep(ts12)**, **RP1** и ее производными

показано наличие гена **гер4**, также определяющего наследование плазмиды RP4. Установлено, что ген **гер1**, вероятно, представляет собой **oriV** репликона RP4. Трансрециссивный характер мутаций позволяет предположить, что **гер2**, **гер3** и **гер4** являются структурными генами, вовлеченными в поддержание и наследование плазмиды RP4.

Комплементационный анализ 98 неконъюгативных транспозированных мутантов (**pAS8-1::TnC**) с плазмидой RPI-6 **гер(ts12)**, позволяет предположить, что один и тот же диффузный продукт вовлечен в процессы наследования и конъюгации репликона RP4.

Изучение Р-специфической несовместимости /Ips P/ у мутантных плазмид показало, что **гер1 (oriV)**, по-видимому, участвует в экспрессии эффекта несовместимости.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУППЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ ПЛАЗМИДЫ ГЕМОЛИЗА H1y I95

Филькова Э.В., Березкина Н.Е.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

Обнаруженная нами ранее способность плазмиды гемолиза H1y I95 подавлять функцию фертильности, детерминируемую F фактором, а также адсорбция F специфического фага /показана электронномикроскопически/ на клетках **E. coli**, несущих плазмиду гемолиза H1y I95, позволили отнести ее к F-подобным плазмидам.

В этой связи в настоящей работе изучена совместимость плазмиды гемолиза H1y I95 с каждой из плазмид-представителей известных F групп несовместимости (**F1-FV**) в одной клетке **E. coli**. Изучение совместимости проводили на полученных нами в опытах конъюгации изогенных штаммах **E. coli** II57, несущих одновременно плазмиду гемолиза H1y I95 и одну из F-подобных плазмид (**R386-F1**, **R222-FII**, **R3-FIII**, **R124-FIV**, **F'lac-FV**).

В результате исследования показана совместимость плазмиды гемолиза H1y 195 со всеми пятью представителями групп несовместимости в клетках *E. coli* AB 1157, пересевавшихся на протяжении 40 дней в мясопептонном бульоне. Однако одновременно обнаружена разная степень несовместимости плазмиды H1y 195 со всеми указанными F-подобными плазмидами в тех же клетках, но пересевавшихся на протяжении 40 дней на плотном мясопептонном агаре, причем несовместимость плазмиды H1y 195 наиболее была выражена с R124(FIV) и с R3(FIII). Совместимость плазмид полностью восстанавливалась, если клетки после 40 пересевов на плотной среде подвергались 10-кратному пересеву в бульоне.

Полученные данные позволили сделать вывод о том, что пересевы клеток *E. coli* AB 1157, несущих плазмиду гемолиза H1y 195 и одну из пяти выше указанных F-подобных плазмид, на плотной среде способствуют проявлению несовместимости и неодинаковая степень несовместимости указывает на разную степень генетической близости этих плазмид. Однако отсутствие несовместимости исследуемых плазмид в клетках, пересевавшихся в бульоне, не подтверждает полной генетической идентичности плазмиды гемолиза H1y 195 ни с одной плазмидой из пяти известных F групп несовместимости. Это позволило нам отнести плазмиду гемолиза H1y 195 к FVI группе несовместимости.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПОЗОНОВ Tn1 И Tn10 НА СОВМЕСТИМОСТЬ ПЛАЗМИДЫ ГЕМОЛИЗА H1y 195 С F-ПОДОБНЫМИ ПЛАЗМИДАМИ

Филькова Э.В., Березкина Н.Е.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

Согласно данным, полученным нами ранее, плаزمида гемолиза H1y 195 является F-подобной, но совмещается с плазмидами-представителями пяти известных F групп несовместимости в клетках кишечной палочки и, по-видимому, относится к FVI группе несовместимости.

В данной работе изучено влияние транспозонов Tn1 (Ap)

и $Tn10$ /Tc/ на совместимость плазмиды гемолиза H1y 195 с R-подобными плазмидами и плазмидой R группы несовместимости. Получены данные, свидетельствующие о различном эффекте транспозонов $Tn1$ и $Tn10$ на совместимость плазмиды гемолиза H1y 195 с R-подобными плазмидами и об отсутствии такого эффекта на совместимость ее с фактором RPI R группы несовместимости.

ТРАНСПОЗИЦИЯ ДЕТЕРМИНАНТЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ТЕТРАЦИКЛИНУ ОТ ФАКТОРА R 222 В ПЛАЗМИДУ ГЕМОЛИЗА H1y 195

Филькова Э.В., Березкина Н.Е., Домарадский И.В.

Всесоюзный научно-исследовательский институт

биосинтеза белковых веществ, Москва

Снабжение плазмид гемолиза/H1y/ дополнительным селективным маркером, например, устойчивости к антибиотику, облегчает работу с этими плазмидами в генетических исследованиях, связанных с селективным отбором плазмид гемолиза.

В настоящее время хорошо известно, что гены устойчивости к антибиотикам могут включаться в хромосому, R факторы, плазмиды деградации, колициногенные факторы в виде транспозонов. Ранее нами была осуществлена транспозиция пенициллинового гена ($Tn1$) от фактора RPI в плазмиду гемолиза H1y 195.

В данной работе предпринята попытка транспозиции детерминанты тетрациклиновой устойчивости от фактора R 222 в плазмиду гемолиза H1y 195. С этой целью плазмиды R 222 и H1y 195 были совмещены в клетках кишечной палочки штамма AB II57. При трансдукции с помощью фага PI, размноженного на этих клетках, была отобрана комбинированная плазида, несущая детерминанты гемолитической активности и устойчивости к тетрациклину. В работе представлены доказательства, что комбинированная плазида образовалась за счет транспозиции $Tn10$ от R 222 в плазмиду гемолиза H1y 195, изучены некоторые свойства комбинированной плазмиды H1y 195: $Tn1$.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ **TOL⁺**-ПЛАЗМИДЫ

Хабихт Я.К., *Виллемс Р.Л.-Э.,

Хейнару А.Л., Порс А.Г.-Р.

Тартуский государственный университет, Тарту;

*Институт физики АН ЭССР, Тарту

В последнее время с помощью рестрикционных фрагментов составлены физические карты **TOL**-плазмиды /мол.вес 118 kb/ штамма *Pseudomonas putida* mt-2 /Downing, Broda, 1979/ и делеционного мутанта **TOL**-плазмиды - pWWO-8 /Downing et al., 1979/, потерявший **TOL**-специфический фрагмент с молекулярным весом около 40 kb /Bayley et al., 1977/. Было показано, что транспозон Tn401 встраивается в **TOL**-плазмиду только двух местах /Benson, Shapiro, 1978/. Эти **TOL**:Tn401 плазмиды дали, в основном, делеционные мутанты типа pWWO-8, но в отдельных случаях делеция достигала до 49 kb. Названные свойства **TOL**-плазмиды связываются с присутствием гомологических последовательностей в рестрикционных фрагментах D, F и K, полученные с рестриктазой HindIII /Downing, Broda, 1979/.

Для многих целей было бы удобно иметь делеционные мутанты **TOL**-плазмиды, сохранившие **TOL**-специфический район плазмиды. Было показано, что после рекомбинации **TOL**-плазмиды с плазмидой RP4 происходит рекомбинация сегмента **TOL**-плазмиды с молекулярным весом около 57 kb в плазмиду RP4 и что этот сегмент перекрывает **TOL**-специфический фрагмент с молекулярным весом 40 kb /Chakrabarty et al., 1978; Jacoby et al., 1978; Nakazawa et al., 1978/. Только в работе Chakrabarty с соавторами /1978/ были представлены данные об образовании самостоятельно реплицирующей нетрансмиссивной **TOL⁺**-плазмиды с молекулярным весом около 43 kb и трансмиссивной **TOL**-плазмиды типа pWWO-8 с молекулярным весом около 76 kb.

В связи с тем, что в работе Chakrabarty с соавторами /1978/ не были представлены молекулярные исследования **TOL⁺**-плазмиды и что др. А.М. Chakrabarty любезно предоставил нам для изуче-

ния этот штамм, мы начали молекулярно-биологическое и генетическое изучение этой плазмиды.

Выделение плазмидной ДНК из **TOL⁺**-штамма оказалось несколько труднее, чем в случае первоначальной **TOL**-плазмиды штамма *Ps.putida* mt-2. Анализ подвижности ДНК **TOL⁺**-плазмиды в 0,7% агарозном геле показал, что молекулярный вес этой плазмиды должен быть не 43 kb, а около 100 kb. Поэтому мы изучали сравнительно ДНК **TOL⁺**- и **TOL⁻**-штаммов в рестрикционном анализе с рестриктазами **HindIII**, **XhoI** и **EcoRI**. Выяснилось, что **TOL⁺**-плазида является делеционным мутантом, где делеция захватывает фрагмент с молекулярным весом около 18 kb и включает в себя **HindIII** фрагменты **G**, **J** и часть фрагмента **C**, или только часть из фрагмента **XhoI** **A** /рис. /. **TOL⁺**-плазида является первой **TOL**-плазмидой, имеющей делецию в области **tra**.

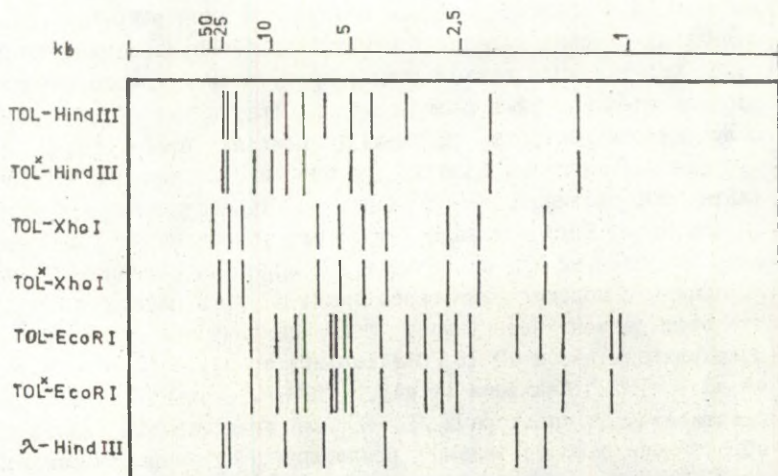


Рис. Рестрикционный анализ ДНК **TOL** и **TOL⁺**-плазмид с рестриктазами **Hind III**, **Xho I** и **EcoRI**. Контроль - рестрикты **λ-Hind III**.

Мы проводили скрещивания типа $RP1 \times TOL^{\pm} \times Ps.putida 340$ $trp^{-}str-r$ и $R68.44 \times TOL^{\pm} \times Ps.putida 340$ $trp^{-}str-r$ на миллипор-фильтрах и провели селекцию TOL^{+} -рекомбинантов при $28^{\circ}C$ и $37^{\circ}C$ в селективных средах, где могли расти только бактерии *Ps.putida 340*, получившие TOL -специфические гены. Положительные результаты были получены только при селекции рекомбинантов на температуре 28° , причем оказалось, что все рекомбинанты содержали кроме TOL^{\pm} -плазмиды еще плазмиду RPI или $R68.44$. Частота проявления $R^{+}TOL^{+}$ -рекомбинантов составляла около 1×10^{-10} .

Опыты по изучению стабильности плазмид $RP1TOL^{\pm}$ и $R68.44TOL^{\pm}$ в штамме *Ps.putida 340* показали, что эти плазмиды не являются рекомбинантными плазмидами типа $RP1-tol$ и $R68.44-tol$. Как известно, TOL -плазида входит в группу несовместимости $P-7$ и является совместимой с R -плазмидами $RPI/=RP4/$ и $R68.44$ из группы несовместимости $P-I$. В наших рекомбинантах происходила элиминация всех маркеров резистентности с высокой частотой, что свидетельствует о том, что в скрещиваниях происходила, вероятно, мобилизация нетрансмиссивной TOL^{\pm} -плазмиды и что в связи с делецией свойства несовместимости изменены у TOL^{\pm} -плазмиды.

Для того, чтобы выяснить, почему в случае TOL^{\pm} -плазмиды TOL -специфические гены не выявляют свойств транспозона, как это бывает в случае TOL -плазмиды, в дальнейшем предусматриваются исследования $RP4-tol$ рекомбинантов и определение расположения $57 kb$ фрагмента на физической карте TOL -плазмиды.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОЗОНА $Tn3$, СОДЕРЖАЩЕГО ДНК ПЛАЗМИДЫ $pUB110$

Хайкинсон М.Я., Бебуров М.Ю., Степанов А.И.
Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Осуществлено встраивание *in vitro* ДНК плазмиды $pUB110$, способной к автономной репликации в клетках *Bacillus subtilis*, в состав транспозона $Tn3$. Встраивание $pUB110$ в транс-

позон **Tn3**, произведенное по сайту расщепления эндонуклеазой **BamHI**, не нарушило выражения гена, детерминирующего устойчивость к ампициллину *E. coli*. Устойчивость к канамицину, определяемая плазмидой **pUB110**, также выражается в клетках *E. coli* в составе гибридного транспозона. Гибридный **Tn3** находящийся на плазмиде **pUB110**, способен транспозироваться в *E. coli* на бактериофаг λ , F-фактор и другие плазмиды. Частота транспозиции такого **Tn3** снижена в 100 раз по сравнению с транспозицией исходного **Tn3**. Поскольку **pUB110** автономно реплицируется в *Bac. subtilis*, полученный транспозон позволяет конструировать *in vivo* гибридные плазмиды, амплифицирующие фрагменты ДНК *E. coli* в клетках бацилл за счет репликона **pUB110**, а также применять систему транспозонов *E. coli* для анализа генетического материала *Bac. subtilis*.

ПЛАЗМИДЫ БИОДЕГРАДАЦИИ

Хейнару А.Л.

Тартуский государственный университет, Тарту

Хорошо известна способность микроорганизмов деградировать разнообразные химические соединения. Так, выяснено, что виды из 70 родов бактерий, дрожжей и филаментных грибов могут деградировать разные углеводороды /**Bernier et al.**, 1975/. В начале 70-х годов было найдено, что разные виды псевдомонад имеют т.н. плазмиды биodeградации, определяющие разлагание алифатных, терпеновых, ароматических и полиядерных ароматических углеводородов. Поэтому штаммы почвенных псевдомонад /*Pseudomonas putida* и др./ могут хорошо расти на средах, содержащих в качестве единственного источника энергии и углерода такие соединения, как мета-толуат, нафталин, камфора, октан, ксилен и салицилат, если они имеют плазмиды **TOL**, **NAH**, **CAM**, **OCT**, **XYL** и **SAL**, соответственно /**Chakrabarty**, 1976/. За последние годы были найдены новые плазмиды биodeградации, такие как **TFD**-плазида, определяющая разлагание гербицида 2,4-Д /**Pemberton, Fisher**, 1978/, **PCB**-плазида,

определяющая разлагание полихлорированных бифенолов типа ДДТ /Kamp et al., 1979/, NIS-плазмида /Thacker et al., 1978/, а также плазмиды, определяющие разлагание лигнина /Paterson, 1979; Salkinoja-Salonen et al., 1979/.

Возросший в последние годы особый интерес к изучению плазмид биodeградации у штаммов *Ps. putida* основан на следующих причинах.

1. Экономические цели. Плазмиды биodeградации позволяют применять соответствующие штаммы *Ps. putida* для продукции микробного белка из остатков нефти и целлюлозной промышленности. Сконструированы мультиплазмидные по плазмидам биodeградации штаммы псевдомонад или т.н. супермикробы, которые применимы для этих целей /Friello et al., 1977/. Плазмиды биodeградации позволяют микробам в окружающей среде разлагать фенольные соединения, гербициды, а также соединения ртути и других ионов тяжелых металлов. Важно еще отметить, что штаммы *Ps. putida* растут в дешевых питательных средах.

2. Безопасность молекулярно-биологических экспериментов. Штаммы являются строгими аэробами и непатогенными для млекопитающих /в том числе для человека/. Они не могут расти при 37°C, т.е. при температуре тела млекопитающих. Кроме того, плазмиды биodeградации сами являются природными температурочувствительными плазмидами. Вышеназванные свойства делают плазмиды биodeградации идеальными векторами в экспериментах по молекулярному клонированию ДНК.

3. Новые возможности для исследования фундаментальных проблем биологии. Плазмиды биodeградации облегчают изучение вопросов о взаимодействии плазмидных и хромосомных генов, механизмы генетической регуляции активности генов, способов репликации нуклеиновых кислот, молекулярной организации генетических единиц, проблем эволюции бактерий и роль соответствующих бактерий в микробных ассоциациях в природе.

Для решения вышеназванных возможностей применения плазмид биodeградации понадобится информация о генетической структуре этих плазмид. Несмотря на короткий период исследования плазмид биodeградации здесь сделано уже много. Наиболее изучены до сих пор, вероятно, *fol*-плазмиды,

где составлены физические и генетические карты этих плазмид, выяснены биохимические механизмы плазмидоспецифических метаболических путей и начаты исследования IS-подобных элементов в составе этих плазмид и расшифровка нуклеотидной последовательности.

ПЛАЗМИДА pBR322 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ВЕКТОРНАЯ МОЛЕКУЛА ДЛЯ *PSEUDOMONAS PUTIDA*

Хейнару А.Л., *Виллемс Р.Л.-Э., Тарк Э.Р.
Тартуский государственный университет, Тарту;
*Институт физики АН ЭССР, Тарту

Векторные плазмиды типа **ColE1** трансформируются с низкой частотой к бактериям *Pseudomonas putida*. Все-таки полученные рекомбинанты являются нестабильными, причем происходит неполная экспрессия клонированной ДНК, что делает эти векторы непригодными для *Ps. putida*. А.М. Chakrabarty/1976/ применял плазмиду **RP1** для клонирования генов у *Ps. putida*. В этом случае клонированная ДНК оказалась тоже нестабильной. Сама плазмида **RP1** трансмиссивная, имеет широкий круг хозяев и большой молекулярный вес. Это все снижает ценность этой плазмиды в экспериментах по клонированию ДНК в *Ps. putida*.

Успеха добились японские авторы, применяя векторную плазмиду **RSP1010** для клонирования генов у *Ps. putida* /Nagahari, Sakaguchi, 1978/. Плазмида **RSP1010** оказалась стабильной в клетках *Ps. putida*. Однако важно отметить, что плазмида **RSP1010** имеет маркеры резистентности к стрептомицину и сульфониламидам, а последние препараты не применимы в случае *Ps. putida*.

Поэтому маркер резистентности стрептомицину один не удовлетворяет экспериментаторов, так как у бактерий *Ps. putida* фон спонтанных антибиотикорезистентных мутантов гораздо выше, чем у *E. coli*.

Исходя из вышесказанного задачей настоящей работы явилось изучить векторную плазмиду **pBR322** у штаммов псевдомонад.

Опыты по трансформации проводили по модифицированной методике Чакрабарти с соавторами /1978/. Выяснилось, что плазмида pBR322 трансформируется к клеткам штаммов *Ps. putida* 85, *Ps. putida* 340 *trp⁻str-r* и *Ps. putida* AC10^{mef} с частотой $1...5 \times 10^{-7}$. Попытка трансформировать плазмиду pBR322 на штамм *Pseudomonas aeruginosa* PAO 2003 *recA⁻arg⁻str-r* оказалась безуспешной.

При изучении уровня резистентности трансформантов к тетрациклину и карпенициллину выяснилось, что он колеблется в широких пределах. Для дальнейшего изучения были взяты трансформанты, уровень резистентности которых /МИК для Tc 500 и для Cb 5000 мкг/мл/ был в 10...20 раз выше, чем у первоначальных штаммов реципиентов. У всех трех штаммов *Ps. putida* трансформанты разделялись на два класса: 1/ сильно нестабильные, потерявшие оба или, в отдельных случаях один маркер резистентности и 2/ стабильные, у которых частота элиминации была ниже 1%. В последнем случае плазмида pBR322 не элиминировалась даже под действием этидиумбромидов /20 мкг/мл/. Из стабильных культур трансформантов была изолирована плазмидная ДНК. Электрофоретическая подвижность и выделяемость плазмидной ДНК оказались сходными с результатами контрольных опытов со штаммом *E. coli*.

МЕСТНЫЕ ШТАММЫ ПСЕВДОМОНАД, ИМЕЮЩИЕ **TOI-**,
SAM-, **OCT-**, **NAH-**, **SAL-** И **TTFD**-ПЛАЗМИДЫ

Хейнару А.Л., *Домарадский И.В., *Бородулина О.В.
Тартуский государственный университет, Тарту;
*Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

Исследователи всего мира имеют плазмиды биodeградации лишь отдельных штаммов бактерий. У всех этих природных штаммов псевдомонад не найдено более одной плазмиды биodeградации. Открытым остается вопрос о распространении в природе бактерий, имеющих разные плазмиды биodeградации.

Мы исследовали возможности выделения штаммов бактерий с разными плазмидами биодegradации из одной почвенной пробы. Было взято 100 граммов почвы из парника Ботанического сада Тартуского гос. университета. После добавления 100 мл бактериального буфера смесь смешивали на качалке в течение 30 минут. После осаждения твердых частиц переносили по 5 мл супернатанта в среду обогащения, где источником углерода являлись м-толуат, салицилат или 2,4-Д /в конечной концентрации 5 мМ/ и нафталин, камфора или октан /гептан/ в фазе эвaporации. Смеси инкубировали при 30°C с аэрацией в течение 2... 4 дней и делали высевы на твердые селективные среды, содержащие вышеперечисленные источники углерода. Выросшие колонии подвергали очистке на этих же средах. Дальнейшему изучению подлежали только быстрорастущие на средах микробы. Выяснилось, что легче всего выделить штаммы бактерий, хорошо растущие на м-толуате. Нетрудно было выделить штаммы бактерий, хорошо растущие на нафталине и салицилате. Штаммы бактерий, хорошо растущие на камфоре, октане или 2,4-Д встречались реже. По предварительным микробиологическим и генетическим данным /передача соответствующих плазмид в процессе конъюгации с реципиентом *Ps. putida* 340 *trp⁻str⁻r*, спонтанная элиминация плазмид и др./ можно заключить, что все выделенные нами из одной почвенной пробы штаммы бактерий имеют *TOL⁻*, *SAM⁻*, *OCT⁻*, *NAH⁻*, *SAL⁻* или *TFD/2,4-Д/-*плазмиды. Применяя модифицированную методику Экхардта /Eckhardt, 1978/ удалось показать у изученных штаммов бактерий наличие плазмидной ДНК. Всего было изолировано и изучено по 10 штаммов бактерий с плазмидами *TOL*, *OCT*, *SAM*, *NAH* и *SAL* и 8 штаммов с *TFD*-плазмидами.

Были поставлены опыты по определению видовой принадлежности изолированных нами 58 штаммов бактерий. Все штаммы бактерий были псевдомонады: 10 - *Ps. putida* /типичные/, 23 - *Ps. putida* /нетипичные/, 16 - *Ps. aeruginosa* и 9 - *Pseudomonas* sp.

Вышеприведенные данные, а также и данные морфологии колонии позволяют сделать вывод, что разные плазмиды биодegradации имеются в разных видах и штаммах бактерий. Следова-

тельно, наличие плазмид биодеградации у штаммов псевдомонад нередкое явление.

ПЛАЗМИДНАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К РИФАМПИЦИНУ У ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*

Хейнару А.Л., Таллмейстер Э.Т.

Тартуский государственный университет, Тарту

Приводятся данные об исследовании резистентности к рифампицину у 220 штаммов энтеробактерий из родов *Escherichia*, *Shigella* и *Salmonella*. Из всех изученных штаммов 22 штамма кишечной палочки обладали способностью к росту на МПА с добавлением рифампицина в концентрации 500 мкг/мл. Эти штаммы *E. coli*, которые все являлись колициногенными и продуцировали колицины типов V+S1, были изолированы из проб кала больного туберкулезом легких, принимающего третий месяц рифампицин внутрь. Наши предварительные исследования позволили предположить, что рифампицинорезистентность у этих штаммов имеет плазмидную природу /Э.Т. Таллмейстер, А.Л. Хейнару, 1975/. Для подтверждения указанного предположения были проведены генетические и молекулярно-биологические исследования, результаты которых представлены в настоящем сообщении.

В опытах по конъюгации резистентность к рифампицину передавалась совместно с генами, определяющими свойства колициногенности. В связи с тем, что донорные штаммы являлись весьма чувствительными к стрептомицину, селекцию трансконъюгантов проводили на средах, содержащих рифампицин и стрептомицин. В качестве реципиентов были выбраны резистентные к стрептомицину и к колицинам V и S1 мутанты штаммов *E. coli* K12 P678 *tre-leu-str-r* и *E. coli* K12C600 *tre-leu-thi-str-r nal-r*. Передача рифампицинорезистентности к штамму-реципиенту *E. coli* P678 осуществлялась в опытах со свежeweделенными донорными штаммами с высокой частотой, а после продолжительного хранения донорных культур в лабораторных усло-

виях, наоборот уже с очень низкой частотой, причем как на штамм *E. coli* P678, так и на штаммы *E. coli* K12 C600 и *E. coli* K12 HI *rec⁻his⁻ilv⁻met⁻arg⁻str⁻r*.

Из одного донорного штамма и из рифампицинорезистентного и колициногенного транскоњюганта *E. coli* K12 C600 была выделена плазмидная ДНК. С помощью агарозного гель-электрофореза показано, что донорный штамм имел две плазмиды: одна - с молекулярным весом около 4 и вторая - 30 мегадальтонов. У транскоњюганта была найдена только плазмидная ДНК с молекулярным весом 30 мегадальтонов. Под действием интактного препарата ДНК от донорного штамма осуществлялась также передача рифампицинорезистентности в процессе трансформации на реципиент *E. coli* K12 C600. При этом выяснилось, что из 130 изученных колоний трансформантов оказались колициногенными только 28 колоний. На основании полученных результатов можно заключить, что плазмидная ДНК с мол.весом 30 мегадальтонов связана с генетической информацией рифампицинорезистентности. Мелкая же плазида с мол.весом около 4 мегадальтонов представляет криптоическую плазмиду и не имеет отношения к рифампицинорезистентности.

Нами проведены также опыты по элиминации рифампицинорезистентности под действием бромида этидиума /в дозе 200 мкг/мл/ и додецилсульфата натрия /в дозе 500 мкг/мл/. Обработка бромидом этидиума приводила к заметной элиминации генов резистентности у первоначального донорного штамма / $p < 0,01$ /, в то время как действие додецилсульфата натрия оказалось менее эффективным.

Таким образом, можно заключить, что рифампицинорезистентность выделенных нами штаммов кишечной палочки имеет плазмидную природу.

СФЕРОПЛАСТЫ ДРОЖЕЙ КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Чернявский В.А., Куприна Н.Ю., Зеров Ю.П.
Всесоюзный научно-исследовательский институт
биосинтеза белковых веществ, Москва

До последнего времени трансформация дрожжей оставалась нерешенным вопросом. В работе **Khan, Sen /1974/** показана возможность генетической трансформации некоторых видов дрожжей, однако вероятность этого события чрезвычайно низка. В случае *S. cerevisiae* был получен отрицательный результат. В предыдущей работе мы показали, что получение сферопластов и обработка их ионами Ca^{2+} существенно повышают проницаемость оболочки дрожжевой клетки для экзогенных ДНК. К аналогичным результатам пришли **Hinnen и др./1978/**, которым удалось осуществить трансформацию дрожжей *S. cerevisiae*, используя клонированный в составе плазмиды **ColE1** фрагмент дрожжевой ДНК, контролирующей синтез лейцина. Приведенные данные указывают на перспективность использования сферопластов для изучения генетической трансформации дрожжей.

Первым этапом в разработке метода генетической трансформации дрожжей явилась отработка условий регенерации сферопластов с образованием жизнеспособных клеток, способных к дальнейшему делению. Сферопласты получали с помощью дрожжелитического комплекса ферментов из актиномицетов разработанным нами ранее методом. Клетки собирали в логарифмической фазе роста /не более 16 часов при 30°C/, что обеспечивало более чем 90%-ное образование сферопластов при обработке ферментом в течение 1 часа. В качестве осмотического стабилизатора использовали 1 М раствор сорбита. Были испытаны следующие варианты регенерации сферопластов: в жидкой среде, в полужидких средах, содержащих желатин и агар, и в плотной агаровой среде. Положительные результаты были получены только при использовании 3%-ного питательного агара согласно методу **Van Solingen, Van der Plaats /1977/**.

Была изучена регенерация сферопластов, полученных из двух штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: промышленного диплоидного штамма "Романешти" и штамма PI92 / α , ade2 / из коллекции ЛИЯФ им. Константинова. Регенерацию изучали как в полной, так и в минимальной питательных средах. Полученные результаты приведены в таблице.

Таблица

Регенерация сферопластов в 3%-ном агаре

Штамм дрожжей	Условия регенерации	Эффективность образования сферопластов, %	Эффективность регенерации, %
диплоидный штамм "Романешти"	полная среда	92 ± 1 /*	95 ± 1 /
	полная среда	90 ± 5 /	100 ± 5 /
	минимальная среда	90 ± 3 /	11,3 $\pm 0,3$ /

* В скобках указана средняя квадратичная ошибка.

Представленные результаты показывают, что на полной среде с высокой эффективностью / $\geq 95\%$ / регенерируют сферопласты обоих используемых штаммов, что указывает на адекватность метода регенерации. Большой интерес представляют данные о возможности регенерации сферопластов в минимальной среде, так как это создает возможность использования для регенерации селективных питательных сред и, соответственно, проводить одновременно с регенерацией селекцию трансформантов. Несмотря на сравнительно низкую эффективность регенерации сферопластов, использование минимальных селективных сред позволяет резко повысить эффективность экспериментов по генетической трансформации дрожжей, так как создает возможность высева на чашку до 10^8 сферопластов /против 10^3 при использовании метода перепечатки колоний/.

Отработка методики регенерации сферопластов позволила нам непосредственно приступить к изучению генетической трансформации дрожжей. Ранее работами лаборатории И.В. Дома-

радского /личное сообщение/ показана возможность трансформации *S. cerevisiae* ДНК дрожжей рода *Candida* с образованием трансформантов, способных утилизировать парафины. Так как указанный признак полностью отсутствует у *S. cerevisiae*, данная модель позволяет выявлять трансформированные клоны при сколь угодно низкой частоте трансформации.

В качестве реципиента мы использовали *S. cerevisiae* PI92 / α , *ade2*/, что позволило контролировать сохранение признака *ade*⁻ у трансформантов. Донором ДНК служила *Candida guilliermondii* ВСБ-774 из коллекции ВНИИсинтез белок. Условия инкубации сферопластов с ДНК воспроизведены по данным работы **Hinnen и др.** /1978/. По окончании инкубации сферопласты собирали центрифугированием, ресуспендировали в тематическом стабилизаторе и переносили в селективную среду регенерации, содержащую в качестве единственного источника углерода парафин $C_{11} - C_{21}$. Через 7-8 суток инкубации при 30°C появлялись колонии розового цвета, характерного для аденин-недостаточных штаммов *S. cerevisiae*. Частота появления таких клонов составляла 10^{-7} . При переносе на селективные питательные среды выявлена потребность исследуемых клонов в аденине и способность использовать в качестве источника углерода как глюкозу, так и парафины. На основании сохранения признака реципиента / *ade*⁻/ и приобретения признака донора /способность утилизировать парафины/ мы делаем вывод, что полученные клоны являются истинными трансформантами.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПОЛИРЕЗИСТЕНТНОГО ШТАММА КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ КЛИНИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Шендеров Б.А., *Рудченко О.Н., Оленина Н.А.

Саратовский государственный медицинский институт, Саратов;

* Всесоюзный научно-исследовательский институт

биосинтеза белковых веществ, Москва

От больного диареей выделен штамм кишечной палочки, резистентный одновременно к двенадцати лекарственным препара-

там /тетрациклину, хлорамфениколу, стрептомицину, неомицину, канамицину, мономицину, ампициллину, цеподину, фуразолидону, фурагину, фурацилину, норсульфазолу/. В условиях длительного хранения при 4°C с пересевами один раз в 3-4 месяца отмечалось возникновение клонов, чувствительных к тетрациклину или неомицинам.

Конъюгационный и трансформационный анализ показал наличие в штамме нескольких групп сцепления детерминант резистентности. Выделены клоны, несущие различные наборы детерминант резистентности к антибактериальным препаратам.

Проверка конъюгативности полученных клонов показала наличие в исходном штамме, по крайней мере, двух конъюгативных плазмид, одна из которых несет детерминанты устойчивости к пяти препаратам: стрептомицину, ампициллину, канамицину, хлорамфениколу и сульфаниламидам, а другая - к тетрациклину. Стрептомицинрезистентные варианты, полученные при трансформации, конъюгативностью не обладали.

Проведено электронномикроскопическое изучение суммарного препарата плазмидной ДНК.

ИЗУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТИВНОСТИ И МОБИЛИЗАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ПЛАЗМИД, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ В ШТАММАХ *E. coli* РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Щипков В.П., Дробышева Н.А., Щипкова Н.И.,
Кузькина С.Н., Пехов А.П.

Университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва

Одно из наиболее важных свойств конъюгативных плазмид заключается в их способности передаваться в клетки-реципиенты и мобилизовать на перенос неконъюгативные плазмиды /в процессе конъюгации бактерий/.

Задачей настоящей работы явилось изучение особенностей конъюгационной передачи, а также мобилизационной способности плазмид pAP3-I /I_{aa}Su/, pAP7-I /Tc/, pAP7-2 /Km/, pAPII-I

/Tc/, pAPI7-I /Hly/, pAP27 /ApL~~am~~S~~mt~~cSu/, pAP28 /L~~am~~S~~mt~~cSu/, pAP29 /ApL~~am~~S~~mt~~cSu/, pAP30 /ApL~~am~~S~~mt~~cSu/, pAP31 /ApL~~am~~S~~mt~~cSu/, pAP33-2 /Km/, pAP36-I /Ap/, идентифицированных нами ранее в клетках штаммов *E. coli*, выделенных от больных людей и сельскохозяйственных животных.

Выполнение этой работы было начато с физико-химической характеристики идентифицированных плазмид. С этой целью препараты плазмидных ДНК, полученные из клеток соответствующих штаммов *E. coli* KI2 в соответствии с методикой **Clewell** и **Helinski** /1970/, обрабатывали рестриктазой **EcoRI** и образовавшиеся фрагменты ДНК исследовали с помощью электрофореза в 0,9% агарозном геле. Молекулярные массы отдельных плазмид, определенные на основании полученных рестриктограмм /в сравнении с эталонной ДНК фага λ /, находились в пределах 30-70 мегадальтон.

Конъюгативность плазмид исследовали путем последовательного переноса их в клетки ряда штаммов *E. coli* KI2 в соответствии со строго стандартной схемой. В работе использовали эталонные реципиентные штаммы **14R525 nal** и **C600 rif** /получены от проф. **T. Arai**, Япония/, а также селекционированные нами штаммы: **API05 trp his lac recA**, происходящий от **JC 544I**, и его производные **API06 str** и **API07 nal**. Штамм **API15 met thi lac nal** является производным штамма **200 PSF⁻** /селекционирован В.П. Шипковым/. Полученные результаты свидетельствуют о существовании значительных различий в частотах передачи отдельных плазмид, которые в условиях стандартных двухчасовых скрещиваний варьировали в пределах $1,0 \times 10^{-5}$ - $1,2 \times 10^{-1}$ /на 1 донорскую клетку/.

В случае бактерий, несущих **F**-подобные плазмиды, наряду с определением частоты передачи плазмидных маркеров исследовали также их способность обеспечивать размножение донорспецифических фагов **F**-группы в реакциях нарастания титров этих фагов /РНТФ/ в соответствии с разработанной схемой /Шипков и др., 1977/. При этом было обнаружено, что для отдельных плазмид активность конъюгативной передачи и величины индексов нарастания титров фагов /ИНТФ/ в значительной мере зависят от особенностей клетки-хозяина. Так, например, для плаз-

мид рАРЗ-I, рАР28, ~~рАР29~~, рАР3I признак положительной РНТФ довольно быстро утрачивался большинством клеток штамма АР105 и его производных АР106, АР107 и не восстанавливался при последующей передаче плазмид среди этих штаммов. Между тем, этот признак в большинстве случаев относительно эффективно восстанавливался при передаче плазмид в клетки штамма I4P525 и /менее эффективно/ в клетки АР115. С другой стороны, для F-подобной плазмиды рАР27 наблюдались стабильно **высокие** уровни ИНТФ и частот передачи, которые не зависели от особенностей используемого штамма-хозяина.

С целью изучения мобилизационной способности /МС/ отдельных конъюгативных плазмид, содержащие их клетки использовали в качестве доноров в "трехродительских" скрещиваниях. В качестве "промежуточного" штамма использовали клетки J53, несущие эталонную неконъюгативную плазмиду SuSm /исходный штамм получен от проф. Т. Arai, Япония/, а в качестве конечного реципиента - штамм АР115. В условиях стандартных 18-часовых скрещиваний частоты мобилизации неконъюгативной плазмиды колебались для отдельных конъюгативных плазмид в пределах от $< 10^{-8}$ до 8×10^{-4} /на I реципиентную клетку/. Вместе с тем, в случае некоторых плазмид не было обнаружено строгого соответствия между уровнями их МС и собственного переноса, что свидетельствует, вероятно, о роли генетической гомологии плазмид в проявлении признака МС.

ПОИСК ФАКТОРОВ ПЕРЕНОСА В БАКТЕРИЯХ ШТАММОВ **E. COLI** ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Щипков В.П., Решетникова В.Н., Дробышева Н.А.,
Губарь Е.В., Пехов А.П.

Университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва

Как сейчас можно предполагать, факторы переноса R и детерминанты резистентности (r) имеют независимое происхождение, причем одно из обоснований в пользу этого представления

должно заключаться в обнаружении "чистых" факторов переноса в бактериях штаммов естественного происхождения. Поиски факторов переноса имеют значение для решения и других вопросов.

Задачей настоящей работы явилось выявление и характеристика факторов переноса в бактериях штаммов **E. coli**, выделенных от человека и сельскохозяйственных животных. В качестве исходных использовали 9 серологически типизируемых штаммов **E. coli**, выделенных до 1960 г., а также 3 штамма **E. coli**, выделенных от больных людей и животных в 1974-1976 годах. Эти штаммы были использованы по той причине, что они давали положительные реакции нарастания титров донорспецифических фагов F-группы /PHTF/, свидетельствующие о наличии в бактериях F-подобных плазмид /Щипков и др., 1977/. Кроме того, были использованы также штаммы **E. coli** API и AP2, в клетках которых ранее была выявлена конъюгативная плаزمида **FB1** /Пехов и др., 1975/, которая как оказалось позднее, в действительности представлена плазмидным комплексом.

В связи с тем, что у бактерий всех этих штаммов нам не удалось выявить каких-либо конъюгативных маркеров лекарственной устойчивости, колициногенности и др., то предполагалось, что они содержат F-подобные плазмиды, являющиеся "чистыми" факторами переноса.

Для подтверждения этого предположения бактерии исходных штаммов использовали в качестве доноров в "трехродительском" скрещивании, которое обеспечивает тест на мобилизацию предполагаемыми факторами переноса эталонной неконъюгативной плазмиды **SuSm** /полученной от проф. **T. Arai**, Япония/. В качестве конечных реципиентов в этих скрещиваниях использовали штаммы **E. coli** J53, APII5 **nal**, API07 **nal**, API06 **str** и C600 **rif**.

На основании положительных тестов на мобилизацию неконъюгативной плазмиды в клетках штамма APII5 были идентифицированы 5 факторов переноса /pAP38, pAP39, pAP40, pAP41, pAP42/, характеризующихся различной мобилизационной способностью /MC/ и положительной РНТФ. В случае клеток штамма AP2 были идентифицированы 2 конъюгативные плазмиды с различной MC /FBI-I и FBI-2/. Плазмида FBI-2 является дерепрессированной

F-подобной плазмидой, тогда как плазида FBI-I не является F-подобной. Следовательно, этот комплекс составлен двумя плазмидами, относящимися к разным типам.

Характеристика идентифицированных плазмид была начата с определения их физико-химических свойств. С этой целью из бактерий штаммов *E. coli*, содержащих факторы переноса вместе с неконоъюгативной плазмидой SuS₂, после удаления последней выделяли плазмидные ДНК. Препараты ДНК, обработанные рестриктазой *EcoR*I, исследовали с помощью электрофореза в 0,9%-ном агарозном геле. На основании полученных рестриктограмм проводили расчеты молекулярных масс исследуемых плазмид /в сравнении с эталонной ДНК фага λ /.

В последних экспериментах идентифицированные факторы переноса классифицировали по тесту несовместимости для выявления степени их филогенетического родства. Однако, в связи с отсутствием у идентифицированных факторов переноса подходящих генетических маркеров для проведения такого исследования, вначале была выполнена работа по их маркированию путем включения в их структуру транспозона, детерминирующего резистентность к ампициллину /T_n Ap/. В качестве носителя T_nAp использовали плазмиду с термочувствительной системой репликации /p^{BC}1 /, которая была селекционирована В.Н. Данилевич и др./1978/ на основе эталонной плазмиды RP4. Редкие клоны бактерий, выращенные при инкубировании на средах с ампициллином в условиях непермиссивной температуры /43°/ двойных плазмидных транскоъюгантов, содержащих соответствующий фактор переноса и плазмиду p^{BC}1, использовали для последующего отбора маркированных факторов переноса.

Определение несовместимости отдельных плазмид проводили в соответствии со схемой, предложенной N. Datta /1977/. В случае дерепрессированной F-подобной плазмиды FBI-2 были исследованы два ее производных варианта - плазида pAP2I-I /Ap^r MS2-S / с мол. массой 54,9 мегадальтон, полученная в результате маркирования FBI-2 с помощью T_nAp, и плазида pAP2I-2 /Ap^r MS2-S / с мол. массой 39,3 мегадальтон, возникающая в результате трансдукционного "укорочения" фагом PI vir плазмиды pAP2I-I. Результаты, полученные при изучении указанных плаз-

мид в тесте на несовместимость с эталонными плазмидами группы FI-FVI, свидетельствует об их способности к относительно стабильному сосуществованию в бактериальных клетках в условиях 5-кратных пассажей /независимо от направления передачи эталонной и исследуемой плазмиды/. На этом основании можно полагать, что плазида F21-2 и ее производные /rAP2I-1 и rAP2I-2/ не относятся ни к одной из известных сейчас шести групп несовместимости F-подобных плазмид и являются, вероятно, представителями еще одной группы несовместимости, которая может быть обозначена как группа FVII.

Вместе с тем, сравнительный анализ совместимости плазмиды /фактора переноса/ rAP2I-2 и эталонных плазмид в клетках двух различных штаммов /API07 и APII5/ свидетельствует о том, что стабильность сосуществования плазмид в отдельных случаях в значительной мере зависит от особенностей бактерий, в которых изучают совместимость плазмид. Это обстоятельство следует учитывать при постановке тестов на совместимость плазмид /факторов переноса/ и анализе получаемых результатов.

ПРИЧИНЫ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ПЛАЗМИДЫ FColVB trp В ERWINIA AROIDEAE

Щукин Н.Н.

Институт химической физики АН СССР, Москва

Важное значение при работе с рекомбинантными плазмидами имеет их стабильность в клетке-хозяине. Мы изучали стабильность композиционной плазмиды FColVBtrp, полученной П. Фредериком *in vivo* в штамме *Erwinia aroideae*. Было обнаружено, что в стационарной фазе роста клетки постепенно освобождаются от плазмидных маркеров. При помощи градиентов щелочной сахарозы мы следили за судьбой плазмидной ДНК. Оказалось, что фенотипические изменения четко коррелируют с изменениями структуры и молекулярного веса ДНК плазмиды. Так, потеря клетками чувствительности к фагу MS2, детерминированной плазмидой, сопровождалась переходом этой ДНК из открытой циркулярной в

ковалентно-замкнутую циркулярную форму, а потеря способности синтезировать колицины сопровождалась делецией части плазмидной ДНК размером примерно 53 мегадальтона. Было обнаружено также, что добавление антибиотиков рифамицина или хлорамфеникола стабилизирует плазмиду.

На основании изложенных данных мы считаем, что существует две основные причины, приводящие к элиминации плазмиды: 1 - открепление плазмиды от мембраны в стационарной фазе роста, приводящее к переходу в ковалентно-замкнутую форму, и, 2 - процессы с участием ферментов рекомбинации, которые ведут к расщеплению ковалентно-замкнутой формы плазмиды **FColV** **Вtrp** на более мелкие репликоны, с последующей потерей этих репликонов при делении клеток.

А в т о р ы т е з и с о в

1. АБАЛАКИНА Е.Г.	II
2. АВДОНИНА Т.А.	I6
3. АВЕРЬЯНОВ А.В.	9I
4. АЛЕКСАНДРОВ А.А.	79, I07
5. АЛЕШКИН Г.И.	I2, I32
6. АМИРОВ Э.Я.	I3
7. АМОСЕНКО Ф.А.	46, I35
8. АНДРЕЕВСКАЯ Е.А.	I02
9. АНИСИМОВА Л.А.	I4
10. АНИСКИН Е.Д.	I5
11. АРСЕНЯН С.Г.	I6
12. АФИНОГЕНОВ Г.Е.	49
13. БАСС И.А.	55
14. БАНДРИН С.В.	69
15. БАРТОШЕВИЧ Д.Э.	29
16. БАЖАН С.И.	20
17. БЕБУРОВ М.Ю.	I47
18. БЕЛОВА Н.В.	2I
19. БЕЛОКРЫСЕНКО С.С.	25, 36
20. БЕЛЯВСКИЙ К.М.	39
21. БЕЛЯЕВ А.С.	28
22. БЕЛЬКИНД А.М.	29
23. БЕРЕЗКИНА Н.Е.	I42, I43, I44
24. БЛИНОВ А.Г.	30
25. БОБКОВ А.Ф.	30
26. БОБКОВА А.Ф.	30
27. БОЙЦОВ А.С.	5I
28. БОНДАРЕНКО В.М.	3I, 86
29. БОРИСОГЛЕБСКАЯ А.Н.	II3
30. БОРОВИК А.С.	33
31. БОРОДУЛИНА О.В.	I5I
32. БОРОНИН А.М.	I4, 88, III, II3
33. БОЧКАНОВ С.С.	36
34. БРУХАНСКИЙ Г.В.	I32

35. БУЗУРТ-ЗАДЕ Д.Л.	53
36. БУРЦЕВА Л.И.	126
37. БУЯНОВА Н.И.	123
38. БЫЛИНСКИЙ А.Ф.	39
39. ВАУЛИНА Т.Г.	13
40. ВЕРЕВКИН В.В.	42
41. ВИЛЛЕМС Р.Л.-Э.	43, 145, 150
42. ВОЛОЖАНЦЕВ Н.В.	46
43. ГАНЕЛИН В.Л.	48
44. ГАРАЕВ М.М.	29, 30
45. ГАУЗЕ Г.Г.	91
46. ГЕРАСИМОВА Л.М.	21
47. ГЛАТМАН Л.И.	49
48. ГОЛОВАНОВ Е.И.	107
49. ГОЛОВИН С.Я.	30
50. ГОЛУБКОВ В.И.	51
51. ГОРЕЛОВ В.Н.	134
52. ГРИГОРЬЕВА С.П.	53
53. ГРИШИН А.В.	94
54. ГРИЦ Н.В.	39
55. ГУБАРЬ Е.В.	160
56. ГУПАЛОВА Т.В.	51
57. ГУСЕВ В.А.	28, 54
58. ДАНИЛЕВИЧ В.Н.	46, 135
59. ДАНИЛЕВСКАЯ О.Н.	55, 79
60. ДЕЖКИН В.В.	12
61. ДЕНИСОВ А.А.	48
62. ДЕНИСОВА Л.Я.	57
63. ДОМАРАДСКИЙ И.В.	53, 78, 84, 89, 100, 102, 103, 104, 109, 110, 131, 144, 151
64. ДРОБЫШЕВА Н.А.	158, 160
65. ЕВДОКИМОВА Н.М.	12
66. ЕРЕМИН А.А.	88, 113
67. ЕРМОЛЕНКО Э.М.	60
68. ЕРШОВ А.А.	123
69. ЗАВЕНЯТИНА Т.Н.	61
70. ЗАПРЕБЕЛЬНЫЙ С.Н.	21, 57, 65

71. ЗЕНЦОВА О.А.	104
72. ЗЕРОВ Д.П.	155
73. ЗИМИНА М.С.	II
74. ЗИНЧЕНКО А.И.	30
75. ИВАНОВА З.А.	103
76. ИЛЫНА Т.С.	68, 134
77. ИЛЫЧЕВ А.А.	68
78. ИОНТОВА И.М.	51
79. ИСАЕВИЧ Л.В.	103
80. ЙОМАРТАС Ю.В.	69
81. КАЛАМБЕТ Ю.А.	33
82. КАМЫНИНА Т.П.	21
83. КАРПОВА И.С.	70
84. КАСАК Л.А.	74
85. КЕРОПИАН Е.А.	104
86. КИЦКА Е.В.	57
87. КИСЕЛЕВ Л.Л.	16
88. КИСЕЛЕВ Н.Н.	68
89. КИСЛИНА О.С.	30
90. КИСЛИЧКИН Н.Н.	78, 84
91. КИЛЬК А.Х.	74
92. КЛИМОВА М.Ю.	15
93. КОВАЛЕВ Ю.Н.	79
94. КОНСТАНТИНОВ П.А.	15
95. КОРОТЯЕВ А.И.	78, 84, 100
96. КОРЯГИНА И.П.	86
97. КОЧЕТКОВ В.В.	88
98. КРЕНДЕЛЕВА Л.Я.	126
99. КРЫЛОВ О.Р.	15
100. КУЗЬКИНА С.Н.	158
101. КУЛАГИН А.Н.	15
102. КУПРИНА Н.Ю.	155
103. КУРНОСОВА Л.М.	89
104. ЛАВИНГ А.Й.	16
105. ЛАРИОНОВ В.Л.	91, 94
106. ЛЕВИНА Н.Б.	109, 125
107. ЛИХОШВАЙ В.А.	20

108. ЛОБАНОВ Т.Е.	98
109. ЛУШНИКОВ А.А.	110
110. ЛЮБЧЕНКО Ю.Л.	33
111. МАКСИМОВ В.Ф.	84
112. МАКСИМОВА Н.П.	39
113. МАЛЮТА С.С.	116
114. МАЛЫТИН Э.Г.	28
115. МАЛЫШЕВА Т.В.	84
116. МАНУВАХОВА М.Ш.	84, 100
117. МЕРТВЕЦОВ Н.П.	30
118. МЕХЕДОВ С.Л.	55
119. МИНДЛИН С.З.	79
120. МИНИНА Т.С.	102
121. МОГИЛЬСКАЯ С.П.	103
122. МОРДВИНОВ В.А.	68
123. МОРОЗ А.Ф.	49
124. НАВАШИН С.М.	48
125. НАУМОВ Г.Н.	104
126. НАУМОВА Г.Н.	107
127. НЕЧАЕВА Е.В.	68
128. НИКИТИН А.Н.	125
129. НУМЕРОВ В.К.	109
130. ОЛЕНИНА Н.А.	110, 110, 157
131. ПАНОВ А.Г.	84
132. ПАНФИЛОВА З.И.	65
133. ПАСТЕРНАК Н.А.	123
134. ПЕРЕБИТОК А.Н.	88, 111, 113
135. ПЕРЕРВА Т.П.	116
136. ПЕСНЯКЕВИЧ А.Г.	91
137. ПЕХОВ А.П.	120, 158, 160
138. ПОРИЦ А.Л.	14
139. ПОРС А.Г.-Р.	145
140. ПУСТОШИЛОВА Н.М.	21, 57, 65
141. ПУТИНЦЕВА Н.И.	65
142. ПУЧКОВА Л.И.	65
143. РАБИНОВИЧ П.М.	69
144. РЕЙНГОЛЬД В.Н.	100

I45. РЕКЕН А.Н.	61
I46. РЕШЕТНИКОВА В.Н.	160
I47. РЭЭМАН К.Д.	129
I48. РОЗИНОВ М.Н.	69
I49. РОМАНОВА Ю.М.	68
I50. РУДНЕВА С.Н.	123
I51. РУДЧЕНКО О.Н.	109, 125, 157
I52. РЯЗАНКИНА О.И.	126
I53. РЯЗАНОВА Л.А.	127
I54. СААРМА М.Д.	16, 129
I55. САБЕЛЬНИКОВ А.Г.	131
I56. САЗЫКИН Д.О.	48
I57. САЙКОВИЧ Е.Г.	21
I58. САЛТАНИК Р.И.	65
I59. САМСОНОВА А.П.	25, 36
I60. СКАВРОНСКАЯ А.Г.	12, 132
I61. СМЕРНОВ Г.Б.	68, 134
I62. СОКТОЕВ С.А.	65
I63. СТАРОВОЙТОВ И.И.	88
I64. СТАРОСТИНА В.К.	21
I65. СТЕЦАНОВ А.И.	II, 69, 141, 147
I66. СТЕЦАНШИН Ю.Г.	46, 135
I67. СТОЛЯРОВА Л.Г.	123
I68. СУВОРОВА Т.И.	89
I69. ТАЛДМЕЙСТЕР Э.Т.	138, 139, 153
I70. ТАЛПСЕИИ Т.Э.	129
I71. ТАРК Э.Р.	150
I72. ТИМОФЕЕВА И.Т.	31
I73. ТООТС И.Э.	129
I74. ТОТОЛЯН А.А.	51
I75. ТЮРИ М.Э.	138
I76. ТЮРИ Э.И.	138
I77. ТЯГУНЕНКО Ю.В.	49
I78. УРЛАПОВА С.В.	141
I79. ФЕДОСЕЕВА В.Б.	79
I80. ФИЛИППОВ В.А.	57
I81. ФИЛЬКОВА Э.В.	103, 142, 143, 144

182. ФОМИЧЕВ Ю.К.	91
183. ХАБИХТ Я.К.	43, 145
184. ХАЙКИНСОН М.Я.	147
185. ХЕЙНАРУ А.Л.	43, 74, 138, 139, 145, 148, 150, 151, 153
186. ХМЕЛЬ И.А.	61
187. ХОЛОДИЛОВ Н.Г.	68
188. ЧЕМЛЕВА Н.Г.	127
189. ЧЕРНИН Л.С.	42
190. ЧЕРНЫЙ Д.И.	33
191. ЧЕРНЯВСКИЙ В.А.	155
192. ЧЕСНОКОВ В.Н.	30
193. ШЕНДЕРОВ Б.А.	110, 157
194. ШЕСТАКОВ В.А.	15
195. ШЕСТОПАЛОВА Н.М.	100
196. ШИТОВ В.Т.	33
197. ШЕКИНА Е.В.	53
198. ШЕЛКУНОВ С.Н.	28, 54
199. ШИПКОВ В.П.	158, 160
200. ШИПКОВА Н.И.	158
201. ШУКИН Н.Н.	163
202. ЯБЛОКОВА М.Б.	49
203. ЯКУБОВ Л.З.	II, 141
204. ЯСЕНЕВИЧ О.В.	53

ПЛАЗМИДЫ КАК ВЕКТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ ПРИ ПЕРЕДАЧЕ
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ. Тезисы докладов IУ
рабочего совещания по программе "Плазмиды".
На русском языке. Тартуский государственный
университет. ЭССР, г. Тарту, ул. Миликооли, 18.
Ответственный редактор А.Хейнару. Сдано в пе-
чать 17.08.79. Бумага печатная 30x42 1/4. Пе-
чатных листов 10,75 (условных 10,0). Учетно-
издат. листов 8,48. МВ 04998. Тираж 450. Ти-
пография ТТУ, ЭССР, г. Тарту, ул. Пялсона, 14.
Зак. № 1136. Цена 60 коп.